

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1929

N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

YVONNE SCHAEFFER

Ancien Chef du Laboratoire d'Éducation Physique
et Ancienne Assistante de Physiologie
à la Faculté de Médecine de Nancy
Médaille d'honneur des Épidémies

LES FERMENTS

CONCEPTIONS MODERNES
RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR QUELQUES FERMENTS ANIMAUX

(TRAVAIL DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS)

Président : M. le Professeur G.-H. ROGER

MASSON ET C^{ie}
ÉDITEURS
PARIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1929

N°

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

YVONNE SCHAEFFER

Ancien Chef du Laboratoire d'Éducation Physique
et Ancienne Assistante de Physiologie
à la Faculté de Médecine de Nancy
Médaille d'honneur des Épidémies

LES FERMENTS
CONCEPTIONS MODERNES
RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR QUELQUES FERMENTS ANIMAUX

(TRAVAIL DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS)

Président : M. le Professeur G.-H. ROGER

MASSON ET C^e
ÉDITEURS
PARIS

I. — Professeurs

Anatomie	MM. ROUVIÈRE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale	CUNÉO.
Physiologie	ROGER.
Physique médicale.....	STROHL.
Chimie médicale.....	DESGREZ.
Bactériologie.....	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	MARCEL LABBÉ.
Pathologie médicale	SICARD.
Pathologie chirurgicale.....	LECENE.
Anatomie pathologique.....	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	M. VILLARET.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	MÉNÉTRIÉR.
Pathologie expérimentale et comparée.....	RATHERY.
	{ CARNOT.
	{ BEZANÇON.
	{ ACHARD.
	{ WIDAL.
Clinique médicale.....	LEREBoullet.
	NOBÉCOURT.
Hygiène et clinique de la première enfance.....	H. CLAUDE.
Clinique des maladies des enfants.....	GOUGEROT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	GUILLAIN.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	TEISSIER.
Clinique des maladies du système nerveux	LÉON BERNARD.
Clinique des maladies infectieuses	{ DELBET.
Clinique de la Tuberculose	{ HARTMANN.
	{ LEJARS.
Clinique chirurgicale.....	{ GOSSET.
	{ TERRIEN.
Clinique ophtalmologique	{ LEGUEU.
Clinique urologique.....	{ COUVELAIRE.
	{ BRINDEAU.
Clinique d'accouchements	{ JEANNIN.
	{ J.-L. FAURE.
Clinique gynécologique	{ OMBREDANNE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	{ VAQUEZ.
Clinique thérapeutique médicale	{ SEBILEAU.
Clinique oto-rhino-laryngologique	{ DUVAL.
Clinique thérapeutique chirurgicale.....	{ SERGENT.
Clinique propédeutique	{ BRANCA.
Professeur sans chaire.....	

II. — Agrégés en exercice

MM.	MM.	MM.
ABRAMI.	ÉCALLE.	MATHIEU.
ALAJOUANINE.	FIESSINGER.	MERCIER (Fernand);
AUBERTIN.	GARNIER.	METZGER.
BASSET.	GATELLIER.	MONDOR.
BAUDOUIN.	GIROUD.	MOURE.
BINET.	HARVIER.	MULON.
BLANCHETIÈRE.	HEITZ-BOYER.	OBERLING.
BROCC.	HOVELACQUE.	OLIVIER.
BRULÉ.	HUTINEL.	PHILIBERT.
CADENAT.	JOYEUX.	QUÉNU.
CHABROL.	LABBÉ (Henri).	RICHT Fils.
CHIRAY.	LARDENNOIS.	SÉZARY.
CLERC.	LEMAITRE.	VALLÉRY-RADOT.
DEBRÉ.	LEROUX.	(Pasteur).
DOGNON.	LÉVY-SOLAL.	VAUDESAL.
DONZELOT	LHERMITTE.	VELTER
DUVOIR.	LIAN.	VERNE.



PUBLICATIONS ANTÉRIEURES

De la Ventilation pulmonaire apparente. Déduction abusive tirée des périmètres thoraciques. — (En collaboration avec M. P. MATHIEU.) — *Société de Biologie de Nancy*, 21 déc. 1925. *C. R. Soc. de Biol.*, XCIV, p. 76.

De la Ventilation pulmonaire apparente. Variabilité des mesures absolues et relatives de la « capacité vitale ». — (En collaboration avec MM. P. MATHIEU et T. PROTITCH.) — *Société de Biologie de Nancy*, 21 déc. 1925. *C. R. Soc. de Biol.*, XCIV, p. 77.

De la Ventilation pulmonaire apparente. Ses relations avec la fréquence respiratoire. — (En collaboration avec M. P. MATHIEU.) — *Société de Biologie de Nancy*, 3 mai 1926. *C. R. Soc. Biol.*, XCIV, p. 1246.

Etudes sur les processus fermentatifs. I. Action de l'amylase. *Société de Biologie de Paris*, 19 mai 1928. *C. R. Soc. de Biol.*, XCVIII, p. 1491.

Etudes sur les processus fermentatifs. II. Action de la trypsine. Mesure des variations de pH au cours de la digestion tryptique et influence de la réaction du milieu sur le processus. — *Société de Biologie de Paris*, 21 juillet 1928. *C. R. Soc. de Biol.*, XCIX, p. 581.

Etudes sur les processus fermentatifs : III. Action de la trypsine. Influence des produits de la digestion sur le processus. — *Société de Biologie de Paris*, 28 juillet 1928. *C. R. Soc. de Biol.*, XCIX, p. 669.

Etudes sur les processus fermentatifs. IV. Action de la trypsine. Influence de la concentration en ferment et en substrat. — *Société de Biologie de Paris*, 28 juillet 1928. *C. R. Soc. de Biol.*, XCIX, p. 670.

Sur le mécanisme d'action de l'amylase. Marche de l'hydrolyse dans le temps. — *Presse Médicale*, n° 59, 25 juillet 1928.

Collaboration aux Thèses de :

T. PROTITCH : La Capacité pulmonaire apparente. (Capacité vitale d'Hutchinson.) Sa valeur comme critère fonctionnel. — *Thèse Nancy*, 1925.

M. BASTIEN : Influence du type de Ventilation pulmonaire apparente au repos sur la composition de l'air expiré. — *Thèse Nancy*, 1926.

A MA MÈRE

A MON PÈRE

Qui a bien voulu faciliter mes recherches bibliographiques dans la littérature allemande, mes remerciements très sincères.

A MA SŒUR

Qui a bien voulu m'aider pour la partie graphique de mon travail, mon témoignage affectueusement reconnaissant.

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR H. ROGER

DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

NOTRE TÉMOIGNAGE TRÈS RECON-
NAISSANT D'AVOIR BIEN VOULU NOUS
FAIRE L'HONNEUR D'ACCEPTER LA
PRÉSIDENTE DE NOTRE THÈSE.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ

LÉON BINET

NOTRE RECONNAISSANCE
TRÈS AFFECTUEUSE.

A MES MAITRES DES HOPITAUX DE NANCY

M. le Professeur G. MICHEL

M. le Professeur FRUHINSOLZ

M. le Professeur Agrégé A. BINET

M. le Professeur J. PARISOT

AVANT-PROPOS

Nous voudrions, au début de ce travail, résultat de deux années de recherches scientifiques, adresser notre première pensée aux Maîtres qui ont présidé à notre formation intellectuelle générale, et dont nous avons eu la joie d'admirer les très belles qualités morales. Ce sont leurs conseils qui nous ont guidée au cours de nos recherches. Puisse ce travail montrer quelques reflets de leurs idées personnelles. Ce serait un de nos vœux les plus chers.

Nous remercions sincèrement M. le Professeur H. Roger d'avoir bien voulu, en nous accueillant dans son laboratoire, nous inspirer le sujet de cette thèse sur une question que de nombreuses recherches antérieures lui ont rendue familière. Nous avons suivi avec un plaisir très vif les leçons remarquables, les exposés brillants et très documentés que ses élèves entendent toujours avec tant d'enthousiasme ; il ne se contente pas de présenter les plus nouvelles acquisitions de la physiologie, mais s'efforce encore de faire ressortir l'intérêt des problèmes biologiques non encore résolus, première orientation des jeunes. N'est-ce pas là la plus belle tâche du Maître ?

M. le Professeur Agrégé Léon Binet, avec son enthousiasme habituel, a bien voulu s'intéresser tout particulièrement à notre travail et nous faire bénéficier de sa grande maîtrise dans toutes les questions de physiologie, en même temps que de ses connaissances très étendues. Mais il a fait plus encore, et par ses encouragements multipliés et par le très bel exemple d'une activité inlassable, il a su nous faire aimer des recherches longues et arides où notre persévérance a eu quelques défaillances. Nous nous souvenons encore de notre première rencontre avec ce savant, avec quelle émotion nous l'avons abordé et combien il fut, dès le premier instant, aimable et protecteur... Que le Maître veuille bien croire à notre res-

pectueuse admiration et l'Ami à notre attachement tout dévoué.

Mais nous ne pouvons songer à ces deux Maîtres qui ont présidé à notre évolution physiologique sans que notre pensée ne se reporte naturellement vers Celui qui a guidé nos premiers pas dans cette belle science. C'est M. Pierre Mathieu, ancien Professeur agrégé de Physiologie à la Faculté de Médecine de Nancy, actuellement Médecin général du Gouvernement d'Algérie, qui nous a orientée vers la recherche scientifique. Combien d'heures n'a-t-il pas consacrées à notre formation, s'efforçant, non pas tant, comme il le disait, de nous enseigner des faits nouveaux, mais de nous apprendre surtout à penser physiologiquement. Il sait avec quelle peine nous avons vu des circonstances regrettables l'éloigner de son laboratoire et l'obliger à abandonner l'œuvre nouvelle qu'il avait créée de toute pièces, et pour laquelle il avait bien voulu faire appel à notre collaboration. Nous serons heureuse s'il retrouve dans ce travail quelques-uns des principes qu'il a bien voulu nous inculquer.

Que notre ami, M. le Professeur agrégé Lucien Cornil veuille bien recevoir le témoignage de notre reconnaissance pour le dévouement qu'il a consacré à notre cause. Nous le remercions bien vivement d'être intervenu avec tant d'autorité sur notre orientation définitive à une époque remplie d'incertitudes pour nous. Son amitié toute dévouée a voulu nous suivre à Paris même, et nous avons été très sensible au bienveillant appui qu'il nous a apporté dans un milieu qui lui était familier.

Nous prions M. le Professeur Rémy Collin, de Nancy, de recevoir l'expression de notre profonde gratitude pour les notions très complètes d'Histologie qu'il nous a enseignées et de notre respectueuse affection pour le Savant, que nous avons été plus à même de connaître dans l'intimité de son laboratoire, lorsqu'il a bien voulu nous confier les fonctions de secrétaire de la Société de Biologie de Nancy. Nous avons pu ainsi apprécier les brillantes qualités intellectuelles et morales de ce Maître.

Notre souvenir ému s'adresse à notre Maître disparu, M. le Professeur Vautrin, de Nancy, qui nous a toujours té-

moigné une bienveillance si paternelle lors de notre externat dans son service.

A M. Henri Hermann, Professeur agrégé de Physiologie à la Faculté de Médecine d'Alger, nous adressons nos remerciements pour les bons conseils que nous avons reçus de lui à nos débuts dans l'étude de la physiologie.

Que tous nos Maîtres de la Faculté et des Hôpitaux de Nancy, MM. M. Lambert, Lucien, Perrin, Robert, Hamant, Caussade, Watrin et Mutel soient assurés de notre reconnaissance très dévouée pour le précieux enseignement et le bel exemple que nous leur devons.

Notre pensée s'adresse également aux Maîtres de la Sorbonne, dont les belles leçons ont si heureusement complété notre formation scientifique, MM. L. Lapique, P. Portier, M. Molliard, Dangeard et R. Combes, qui a bien voulu nous offrir le concours de sa grande expérience technique au début de nos recherches.

Nous sommes en particulier profondément reconnaissante à nos Maîtres de l'Institut Pasteur, MM. G. Bertrand et P. Javillier, dont les brillants enseignements nous ont été un secours si précieux pour la préparation de notre thèse, en nous donnant les notions de Chimie biologique indispensables.

Mais nous nous en voudrions de ne pas témoigner à notre illustre compatriote, M. le Président Raymond Poincaré, le témoignage de notre très respectueuse gratitude pour le bienveillant appui qu'il nous a donné sur les instances de l'Ami qui nous est également cher à tous deux.

Nous savons assez avec quelle ardeur il se fait le protecteur de la jeunesse intellectuelle, et quelle part importante de son temps, il n'hésite pas à accorder à la défense de ses intérêts, malgré une activité débordante consacrée au Bien Public.

INTRODUCTION

« Les lois biologiques ne doivent plus être opposées aux lois qui régissent la matière inanimée. Si, parfois, elles paraissent en désaccord avec ce que nous enseigne la physique ou la chimie, c'est qu'elles sont moins simples, qu'elles dépendent d'influences multiples et souvent opposées. Le mécanisme paraît différent parce qu'il est plus compliqué.

« De toutes les propriétés de la cellule, la fermentation a été considérée pendant longtemps comme spéciale ou spécifique. Le ferment était appelé matière semi-vivante, il exerçait une influence qui semblait quelque peu mystérieuse. Nous savons aujourd'hui que le pouvoir fermentatif appartient à des éléments minéraux qui se trouvent à l'état colloïdal. Les métaux colloïdaux préparés artificiellement jouissent de quelques propriétés diastasiques qui semblaient appartenir exclusivement à la matière élaborée par les cellules. Ce qui est encore plus curieux, c'est que ces mêmes métaux deviennent sensibles comme des cellules à l'action des substances toxiques...

« Ainsi, une substance minérale, à la condition qu'elle se trouve en un état moléculaire particulier, peut acquérir certaines propriétés de la matière vivante et, comme elle, se montrer sensible à l'action des poisons. »

Ainsi s'exprimait le Professeur H. Roger dans sa leçon d'ouverture du Cours de Physiologie en 1926. Et dans la même leçon, ce Savant faisait ressortir également l'importance de l'introduction en biologie des sciences inorganiques : physique et chimie, et l'utilité de ramener les phénomènes vivants à des lois simples exprimées par des formules mathématiques.

L'histoire évolutive de ce chapitre fondamental de la physiologie ne saurait être mieux résumée que par ces quelques lignes qui donnent un aperçu succinct de la genèse de nos

conceptions actuelles sur le mécanisme essentiel de l'action fermentative et sur les lois qui président à cette action.

Quelles voies différentes ont suivies les divers auteurs pour aboutir aux idées nouvelles ? Comment se sont dégagées les notions primordiales qui dominent actuellement cette question, quelles étapes ont marqué un stationnement forcé sur la route incertaine et chancelante des chercheurs ? Une rapide esquisse historique nous fera parcourir cette évolution.

Si l'idée de « fermentatio » (du latin *fervere*, bouillonner) remonte, en réalité, à la plus haute antiquité, il semble bien que, tout d'abord, seule la fermentation microbienne ait attiré l'attention des auteurs anciens. Nous n'insisterons pas sur la période moyenâgeuse, où l'empirisme et les conceptions erronées ont entravé toute progression scientifique.

C'est à Stahl, le premier, que revient le mérite d'avoir introduit la notion d'énergie, de mouvement, dans les processus fermentatifs.

Mais la première théorie précise du mécanisme d'action de ces corps étranges, théorie extrêmement féconde, puisqu'elle devait rester la première pierre, base de l'édifice des théories chimiques modernes, revient incontestablement à Berzélius et Mitscherlich qui ont ramené l'action fermentative à une action de catalyse, à une action de contact, et Berzélius, suivant une expression originale, définissait les catalyseurs comme des corps qui « par leur simple présence, sont capables d'éveiller, en quelque sorte, des énergies assoupies ».

Il semble bien que le premier ferment « non figuré », suivant la désinence de Kühne, ait été l'émulsine, découverte par Robiquet dans les amandes amères, puis étudiée par Liébig et Wöhler. Ce n'était que le premier pas dans une voie nouvelle. Bientôt furent décelées la pepsine (Eberlé et Schwann 1836), la myrosine (Buci), la trypsine (Corvisart), l'amylase ou diastase de Payen et Persoz. Depuis cette époque, le nombre des ferments n'a cessé de s'accroître et la liste est loin d'être close. C'est par analogie avec l'activité de la Levure que ces corps furent également appelés ferments.

Une nouvelle théorie de l'action fermentative règne alors en maîtresse, c'est la théorie de la décomposition de von Liebig, qui considère les fermentations comme la continuation

d'un ébranlement de la molécule, menant à la désagrégation, provoquée par une décomposition chimique de la matière fermentante. Nous sommes évidemment bien loin de la simple action de contact dans le sens de Berzélius, et une telle théorie, dont le mérite évident est de mettre en relief les décompositions chimiques successives qui se déroulent parallèlement à l'action du ferment et en sont, pour ainsi dire, le témoignage, ne devait avoir cependant qu'une durée bien éphémère. En faisant intervenir les produits de la réaction comme agents actifs des décompositions ultérieures, elle s'oppose au fait généralement admis aujourd'hui d'une action paralysante de ces produits sur le cours de la réaction.

C'est Pasteur qui a posé le principe de la distinction des ferments, d'après leur origine, en « *ferments figurés* » ou « *organisés* », liés à l'activité vivante des organismes, en opposition avec les « *ferments solubles* » ou « *inorganisés* », qui agissent lorsqu'ils sont séparés des cellules vivantes. On sait que cette seconde classe avait déjà reçu le nom de « *diastases* » (Διάστασις, séparation) après la découverte de Payen et Persoz (1883), désignation qui a surtout été défendue par E. Duclaux. Mais en raison des confusions possibles par l'emploi du même nom de ferment pour désigner des éléments différents, Kühne attribua aux ferments solubles le nom « *d'enzymes* », (Εν, dans Ζύμη, levain), défendu par Bayliss. Cependant différents auteurs, dont les représentants les plus illustres furent Berthelot, Traube et Hoppe-Seyler, avaient déjà insisté sur le fait que les ferments figurés ne s'opposent pas aux ferments solubles, puisqu'ils doivent en réalité leurs propriétés essentielles à ces mêmes ferments solubles qu'ils contiennent, et que, par conséquent, une même appellation devait désigner ces deux catégories. C'est un point sur lequel nous nous étendrons plus particulièrement.

L'étude approfondie des ferments microbiens d'une part, des ferments dits solubles d'autre part, a réellement montré combien serait artificielle une distinction absolue entre ces deux classes ; il semble que le mécanisme de ces actions présente de grandes analogies et que les propriétés essentielles de ces agents, à savoir la disproportion énorme entre le poids du ferment et les poids des produits transformés, la spéci-

ficité, sont sensiblement les mêmes, ainsi que l'action de divers agents physiques ou chimiques : température, réaction du milieu. Il semble bien qu'il n'y ait dans cet ordre que des différences de degré : tandis que la Levure de bière, p. ex., dans l'eau sucrée, en milieu anaérobie, est capable de transformer 3 fois son poids de sucre environ, une partie de sucrase suffira pour intervertir 200.000 fois son poids de saccharose.

En ce qui concerne la température, nous observons même sensibilité de tous les ferments, et une température mortelle, variable évidemment pour chacun d'eux (G. Bertrand et M^{me} Rosenblatt : *Recherches sur la tyrosinase*). La température optimale est généralement un peu plus élevée pour les diastases que pour les ferments figurés.

On sait également que les diastases sont généralement moins sensibles à l'action des toxiques que les ferments figurés, en particulier aux antiseptiques, propriété fréquemment utilisée pour discriminer les actions diastasiques et microbiennes. Cependant, la résistance même des diastases envers les antiseptiques est limitée, et il faut généralement admettre que ces substances ont une action inhibitrice variable pour chacun, très faible pour le toluène p. ex., très marquée, au contraire, pour la formaldéhyde, soit que, pour certains auteurs, ce corps agisse en abaissant la tension superficielle, soit que, pour d'autres, il modifie la réaction du milieu. Quant à la toxicité assez irrégulière des antiseptiques pour les ferments organisés, elle serait, d'après Ch. Richet, très relative, puisqu'on peut l'atténuer ou même la supprimer, suivant les résistances individuelles plus ou moins grandes, par cultures successives du ferment sur un milieu renfermant le toxique. Ainsi, par addition au milieu de culture de différents toxiques : KBr, Arsénates, Sels de métaux lourds, en proportions variables, cet auteur a pu obtenir des souches absolument normales et parfaitement accoutumées aux toxiques.

D'après ce qui précède, on peut donc facilement s'imaginer que si l'on range sur une même échelle, les ferments figurés et les ferments solubles, on obtiendra pour toutes leurs propriétés une courbe continue, dont les différents degrés mar-

queront simplement les écarts individuels sans qu'aucune discontinuité brusque ne permette de délimiter d'une façon sûre les deux groupes de ferments.

Mais il nous semble que la question a été définitivement tranchée par les belles recherches de Büchner. Cet auteur, s'appuyant sur le fait que la mort lente des cellules détruit généralement, en même temps que la substance cellulaire elle-même, les ferments qu'elle contient, a extrait grâce à l'action mécanique puissante de la presse hydraulique un liquide qui, mis en présence de sucre, le transforme, tout comme la Levure elle-même, en acide carbonique et alcool. Ainsi, l'action de la Levure doit être attribuée plus simplement à celle d'un seul et même agent actif, à la zymase.

Que de tels corps apparaissent librement sécrétés dans les sucs digestifs ou dans le sang, qu'ils se détachent des cellules seulement après leur mort, comme p. ex. les ferments des leucocytes, des Bactéries ou des Levures, ou qu'ils restent en quelque sorte accrochés aux éléments cellulaires et périssent avec eux, si une intervention étrangère : modification de la tension superficielle, autolyse ou simple action mécanique ne se produit pas, il n'en est pas moins vrai que la fermentation, chaîne continue et une, est toujours l'œuvre d'un seul et même agent, le ferment, qui se forme toujours de la même manière et qui se comporte toujours d'une façon identique, qu'il fasse ou non partie indivisible d'un substratum protoplasmique. Et c'est pourquoi la classification arbitraire en endo — et exoenzymes ne nous semble pas non plus mériter d'être retenue.

Mais pourquoi le comportement des ferments liés aux organismes vivants semble-t-il si différent de celui des ferments libres, à la fois plus irrégulier et plus complexe ? Les recherches modernes de l'Ecole Allemande ont bien montré, en particulier, quelle importance l'on doit accorder au degré de pureté des ferments, si l'on veut pénétrer plus avant dans leur mécanisme d'action. On conçoit, grâce à ce fait, que puisque les impuretés constituées par une faible quantité de substance protéique ou d'électrolytes liés au ferment suffisent à modifier considérablement les effets observés, le substratum complexe des organismes vivants doit inter-

venir très énergiquement pour modifier ou masquer les réactions des ferments qu'ils contiennent. D'autre part, un ferment n'existe jamais seul dans un organisme, puisque la cellule vivante la plus simple contient déjà un nombre considérable de ferments ; si l'on songe aux interdépendances de ces ferments, aux actions réciproques qu'ils peuvent exercer l'un sur l'autre, à la variabilité des circonstances de leur entrée en jeu, à la complexité des réactions intermédiaires, on ne peut s'attendre qu'à des manifestations extérieures très différentes. C'est vraisemblablement à ces raisons qu'il faut attribuer le fait que ces agents aient été si longtemps divisés soit en ferments figurés et solubles d'une part, soit en ferments endo- et exocellulaires d'autre part. Là, comme dans bien d'autres questions biologiques controversées, il ne s'agit que de différences de degré, peut-être aussi d'adaptation à un but différent, suivant la conception d'Oppenheimer. N'est-il pas nécessaire, en effet, que les ferments digestifs, qui doivent agir sur des complexes alimentaires colloïdoexogènes et non diffusibles, puissent venir directement en contact avec ces matériaux, tandis que les ferments du métabolisme, agents de la nutrition élémentaire, n'ayant à remplir qu'un rôle intra-cellulaire, n'ont pas besoin d'être sécrétés.

Des expériences aussi déterminantes que celles de Büchner devaient jeter un grand discrédit sur les nombreuses théories écloses au cours du XIX^e siècle. Par suite des progrès des sciences inorganiques, l'étude des fermentations avait alors pris un nouvel essor et toute une floraison de nouvelles théories s'était épanouie. Les conceptions vitalistes qui les dominaient devaient leur offrir un appui bien fragile. Citons parmi les plus importantes la théorie physico-moléculaire de Naegeli (1879). Cet auteur admet une amplification des vibrations de la substance catalytique telle que le simple contact avec cette substance produit une désagrégation des molécules du substrat, sans que la substance désagrégeante soit modifiée. Mais, fidèle au principe du vitalisme, l'auteur n'envisage que les ferments indissolublement liés au protoplasma vivant dont ils dépendent étroitement ; s'attachant ainsi au sens historique du mot « ferment », il laisse résolument

de côté ceux de ces corps qui agissent en dehors des cellules vivantes.

Mentionnons également la théorie d'Arthus, complètement abandonnée, pour qui les ferments interviendraient non pas en tant que substances chimiques définies, mais simplement comme des énergies.

Pour Fodor, ce seraient des formes colloïdo-chimiques de protéïnes déjà connues qui, dans des conditions spéciales, interviendraient comme ferments. Or, actuellement on se détache de plus en plus des conceptions de la nature protéïque des ferments, et on les considère comme des substances de nature particulière, dont l'action est liée à la structure et aux propriétés colloïdales.

Nous verrons plus loin comment les travaux modernes sur la nature des ferments, sur leur mode d'action dans des conditions expérimentales bien définies ont permis de poser de nouvelles bases à la nature de l'action fermentative, et comment l'introduction des mathématiques en biologie a permis de ramener ces phénomènes à des lois relativement simples.

Nous avons été tout particulièrement frappée au cours de nos recherches bibliographiques par l'extrême dispersion des publications françaises relatives aux fermentations. De très nombreux faits nouveaux se sont, en effet, accumulés sur cette question, et comme il n'existe en France aucun périodique spécial tel que « Fermentforschungen », p. ex., ces publications sont très disséminées. C'est pourquoi nous nous sommes proposé de rassembler les principaux résultats modernes, et nous avons divisé notre travail en deux parties :

I. — Une étude générale sur les actions fermentatives, pour laquelle nous avons adopté le plan suivant :

- a) Nomenclature des ferments.
- b) Conceptions actuelles sur la nature chimique des ferments.
- c) Cinétique des actions fermentatives.
- d) Biologie des ferments.

- e) Les ferments et la pathologie.
- f) Les ferments, agents thérapeutiques.

Notre tâche a été grandement facilitée par les ouvrages très documentaires, quoique d'une lecture difficile, d'Oppenheimer :

Die Fermente und ihre Wirkungen. Georg Thieme, Leipzig, 1924-25.

Lehrbuch der Fermente. Georg Thieme, Leipzig, 1927.

Et par l'excellente monographie de Bayliss:

The nature of Enzyme Action, 5^e éd., Longmans, Green and C^o. Londres, 1925.

II. — Recherches personnelles.

- a) Etude de l'amylase.
 - b) Etude de la trypsine.
 - c) Etude de la lipase.
-

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

NOMENCLATURE DES FERMENTS

La découverte de ferments d'origine diverse, de comportement variable, d'activité plus ou moins grande, devait naturellement conduire à répartir ces corps dans des groupes déterminés, indiquant à la fois leurs analogies et leurs différences. Aussi les essais de classification furent-ils très nombreux. Si les premiers auteurs se basèrent simplement sur leur origine différente, l'étude plus approfondie de ces corps montra bientôt qu'ils agissaient électivement sur des substrats de nature chimique différente, suivant un mode d'action particulier à chacun. C'est précisément cette activité spécifique qui domine actuellement toutes les tentatives de classification rationnelle des ferments. Remarquons, cependant, que l'on n'a pu, jusqu'ici, adopter une classification définitive et qu'il y a encore, entre les auteurs, des divergences assez grandes sur les principes mêmes de cette systématisation ; on conçoit, évidemment, que, seule, la connaissance exacte de la nature chimique de ces agents apportera la solution de ce problème. Nous nous contenterons donc de donner un essai de classification, indiquant dans leurs grandes lignes, les conceptions de l'Ecole Française formulées par G. Bertrand, et de l'Ecole Allemande, d'après Euler.

Deux grands groupes forment la base de cette classification :

I. — Les *Hydrolases* d'Oppenheimér, ou ferments hydrolysants, les plus répandus, agissant en fixant l'eau sur les éléments, tout comme l'eau surchauffée, les alcalis ou les acides ;

ce processus, généralement réversible, aboutit à l'établissement d'un équilibre indépendant de la température.

D'après la nature chimique des substrats attaqués, ces ferments se divisent de la façon suivante :

A. — LES FERMENTS DES LIPIDES, comprenant :

1° Les *lipases* animales et végétales dissociant les glycérides en glycérine et acides gras.

2° Les *phosphatases*, libérant, des phosphatides, les alcools et l'acide phosphorique.

3° La chlorophyllase, la tannase, la phytase et les sulfatases.

B. — LES FERMENTS DES GLUCIDES, comprenant :

1° Les *polyases*, divisées d'après la nature du sucre formé à l'hydrolyse, en :

a) ferments des dextrosanes : amylase, cellulase;

b) ferments des fructosanes : inulase, sucrase ou saccharase ;

c) ferments des manno-galactanes : hémicellulases ou cytases ;

d) ferments des arabo-galactanes : pectase ;

e) ferments des xilanes ;

f) à ce groupe se rattachent les nucléases, libérant des acides nucléiques le d - ribbose.

2° Les *ferments des glucosides*, comprenant :

a) les ferments des hologlucosides : α — glucosidases (maltase, tréhalase), et β — glucosidases (cellobiase) α — galactosidase et β — galactosidase (lactase).

b) Les ferments des hétéroglucosides : émulsine (amygdaline $\rightarrow$ glucose, CNH + benzaldéhyde).

C. — LES FERMENTS DES PROTIDES et leurs dérivés, comprenant :

1° Les *protéases* : *peptase* ou pepsine (protéines $\rightarrow$ albumoses + polypeptides) ; *tryptase* ou trypsine (protéines, poly-

peptides → peptides, acides aminés) ; *papaïne* (protéines → polypeptides).

2° Les *peptidases* ou *éruptases*, attaquant le groupement CO-NH (polypeptides → acides aminés).

3° Le *lab-ferment* ou *chymase*.

4° La *thrombase*, dont l'existence en tant que ferment est douteuse (Rettger) ;

5° Les *amidases* : *uréase* (urée → carbonate d'ammonium) ; *arginase* (arginine → urée + ornithine) ; *hippuricase* (acide hippurique → glyocolle + acide benzoïque) et *guanase*.

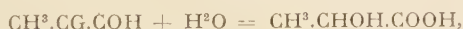
II. — Les « *Clastases* » ou *Desmolases* (δυσμός, lien) de Neuberg et Oppenheimer, ferments cellulaires du métabolisme, comprenant les agents des fermentations lactique et alcoolique.

Les zymases qui provoquent la désagrégation des sucres en alcool éthylique et gaz carbonique seraient constituées par plusieurs ferments, en particulier une *aldéhydrase* ou *aldéhydomutase*, ferment oxydant, et une *carboxylase* libérant le gaz carbonique. Mais, en outre, d'autres ferments provoquent vraisemblablement la première phase du processus et la destruction de la matière sucrée peut être résumée de la façon suivante :

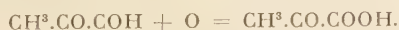
Il se forme d'abord de l'*aldéhyde glycérique*, puis un corps à 3 atomes de C, le *méthylglyoxal* :



par absorption d'eau, sous l'influence de la *glyoxalase* de Dakin, ce corps se transforme en *acide lactique* stable :



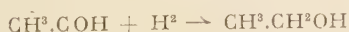
ou en *acide pyruvique* :



Sous l'influence de la *carboxylase*, l'*acide pyruvique* se transforme en *acétaldéhyde* :



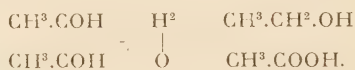
Grâce à une *aldéhydomutase*, l'*acétaldéhyde* donnerait de l'*alcool éthylique* :



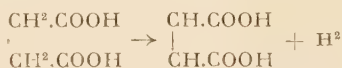
Si on fixe l'acétaldéhyde par addition de bisulfite de sodium ou de noir animal; l'aldéhyde glycérique est réduit à l'état de glycérine :



En milieu *alcalin*, l'acétaldéhyde se transforme, suivant la réaction de Camizzaro, en alcool et acide acétique :



Font également partie de ce groupe, les *acidodéhydrases*, éléments de la régression des acides organiques qui rendent compte de la transformation de l'acide succinique en acide fumarique :



de l'acétaldéhyde en acide acétique :



Les *purinedéhydrases* oxydent la xanthine en formant de l'acide urique qui, oxydé à son tour, forme l'allantoïne.

III. — Outre ces deux principaux groupes et se rapprochant du deuxième, les *oxydases* oxydent certains phénols en donnant des quinones. Remarquons que les éléments minéraux : fer (Warburg), manganèse (G. Bertrand), cuivre, semblent jouer un rôle fondamental dans ces oxydations, vraisemblablement par la formation de complexes intermédiaires (peroxydes métalliques) absorbant et restituant l'oxygène ; ces éléments minéraux interviendraient donc d'une manière analogue à celle de l'hémoglobine et de la chlorophylle et l'on peut se demander s'il y a lieu de classer ces oxydases parmi les ferments.

Plus douteuses encore sont les *peroxydases*, décomposant les peroxydes, (H^2O^2 en particulier), en libérant l'oxygène atomique actif, capable d'être ensuite fixé par des corps aromatiques (accepteurs), dont l'oxydation indirecte se manifeste par un changement de coloration.

A ce groupe se joignent les *tyrosinases* qui oxydent la tyro-

sine, acide aminé phénolique, en formant des pigments noirs ; et la *catalase* qui décompose le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , en H_2O et O moléculaire fonctionnant vraisemblablement comme accepteur d'H. Il s'agirait, dans ce cas, d'une réaction de défense de l'organisme ayant pour but la destruction des peroxydes toxiques en excès.

Mais, d'après Wieland, les oxydations biologiques résulteraient indirectement de l'activation de l'hydrogène, sous l'influence de l'action de certains ferments, les déshydrases ou réductases (Abelous et Gérard).

IV. — A ces groupes, il y aurait lieu d'ajouter les ferments des synthèses ou *synases* de G. Bertrand, représentés par la phosphatèse d'Euler qui, d'après Embden, Brogh, favoriserait la formation, à partir de l'acide lactique, du lactacido-gène ou acide hexose diphosphorique, composé intermédiaire du métabolisme des glucides dans le muscle.

On a montré, d'autre part, que si l'on ajoute à la fermentation alcoolique, des aldéhydes aromatiques, on obtient un produit de synthèse, dérivé de l'acide pyruvique, l'acide phénylpyruvique, acide-alcool cétonique, $CH^3 \cdot CO \cdot CHOH \cdot C^6H^5$; cette réaction synthétisante s'effectuerait sous l'influence d'un ferment particulier : la carboligase de Neuberg.

On pourrait également admettre l'existence d'*isomérases* activant les réactions d'isomérisation extrêmement fréquentes : transformation d'un sucre : glucose ou maltose, en ses isomères s'effectuant au cours des réactions, comme nous en verrons un exemple dans l'étude de la dissociation des polyoses p. ex.

CHAPITRE II

CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LA NATURE CHIMIQUE DES FERMENTS

La détermination de la nature chimique des ferments permettrait de connaître à la fois leurs propriétés essentielles et les conditions de leur action. Mais on peut dire que cet important chapitre de leur histoire constitue l'un des problèmes les plus ardues de la chimie contemporaine.

Il exige, en effet, l'emploi des méthodes les plus fines de la chimie biologique, par suite de la présence de ces éléments en quantité extrêmement petite dans les suc digestifs ou les cellules. Isoler ces corps par des méthodes appropriées, puis s'efforcer de les séparer des substances protéiques et minérales qui les accompagnent, tel est le double but poursuivi dans l'étude chimique des ferments. Nous indiquerons donc les principales méthodes utilisées dans ce but et les hypothèses émises sur la nature de ces corps.

MÉTHODES D'OBTENTION DES FERMENTS.

Le procédé le plus simple permettant de mettre en évidence l'activité fermentative consiste évidemment à faire agir les suc qui les renferment sur des substrats appropriés ; c'est ce que l'on a fait pour un certain nombre d'entre eux : pepsine du suc gastrique, trypsine du suc pancréatique, érepsine du suc intestinal, amylase de la salive, protéase du suc d'Ananas ou du Pavot.

Mais de nombreux ferments sont contenus à l'intérieur des éléments cellulaires, d'où on peut les extraire par différentes méthodes :

1° Par dissolution ou macération dans l'eau pure ou additionnée d'un antiseptique : toluène, chloroforme, thymol, fluorure de sodium ; la membrane cellulaire perméable laisse passer un certain nombre de ferments. Notons, d'ailleurs, qu'il s'agit généralement de pseudo-solutions dans l'eau.

Lœw a préconisé la macération dans l'eau alcoolisée. Mais il est parfois avantageux de faire précéder cette macération d'une dessiccation ; dans le cas de la Levure, Lebedew a utilisé la dessiccation à 20-25° ; E. Fischer et Croft Hill ont employé la dessiccation par l'air chaud pour extraire la sucrase.

2° Von Wittisch a utilisé comme solvant la glycérine qui détermine la plasmolyse des éléments cellulaires frais ; on a obtenu ainsi des solutions stables d'oxydases très actives contenant peu de protéiques et généralement aseptiques.

3° Dastre a montré que l'on pouvait déterminer cette plasmolyse par des réactifs appropriés : chloroforme, éther.

4° L'autolyse prolongée des cellules détruit la structure cellulaire et libère des ferments protéolytiques nombreux mais très impurs ; on a pu ainsi extraire de la Levure, la sucrase. Mais certains ferments ne peuvent supporter la réaction acide de l'autolysat (maltase).

5° L'extraction est plus difficile lorsque le ferment est intracellulaire ; il faut alors soumettre le tissu à désagréger à une action mécanique puissante.

Trois méthodes ont été utilisées dans ce but : Büchner (1903) obtint l'agent spécifique de la fermentation alcoolique par moûture de la Levure avec du sable et broyage de cette substance par la presse hydraulique à une pression de 300 atm.

Par broyage du mycélium d'*Aspergillus Niger* et macération dans l'eau, MM. G. Bertrand et P. Javillier ont extrait de cet organisme des pectases et des présures.

Rowland (1901) a effectué la désintégration des cellules de la Levure en plaçant une roue dentée animée d'une rotation très rapide dans la mixture de cellules et de sable. Harden a appliqué une méthode analogue aux Bactéries par solidification des cellules par l'air liquide et broyage mécanique dans un mortier d'acier.

Wiechowski et Wiener (1907) ont réussi à extraire l'uricase du foie et du rein, en réduisant le tissu en une pulpe fine,

en le hachant, puis en le passant à travers un fin tamis. La masse ainsi obtenue, étendue sur des plaques de verre, est ensuite desséchée aussi complètement que possible par un courant d'air chaud, puis broyée dans un moulin avec du toluène qui la débarrasse des lipoïdes ; elle est conservée sous forme de poudre fine.

MÉTHODES DE PURIFICATION DES FERMENTS.

Après avoir isolé les ferments, on s'est efforcé de concentrer leur propriété caractéristique sous un très petit volume en les débarrassant des substances étrangères, protéiques et minérales, qui les accompagnent.

1^o L'une des plus anciennes méthodes connues est leur séparation sous forme de précipités actifs. Dans ce but, on utilise généralement la précipitation par l'alcool ou par le mélange alcool-éther et dessiccation dans le vide. Toutefois, il est utile de remarquer que le contact prolongé de ce liquide avec le ferment amoindrit son activité, particulièrement dans le cas de la zymase. C'est pourquoi Willstätter emploie de préférence l'acétone plus anodin.

2^o Divers auteurs ont utilisé la précipitation par les sels neutres, le sulfate d'ammonium, p. ex.

3^o On a préconisé la formation de certains précipités : phosphate tricalcique (Cohnheim), ou phosphate d'uranyle (Jacoby), entraînant le ferment ; il s'agit, en fait, d'une adsorption du ferment.

4^o Brücke a obtenu une pepsine active en entraînant le ferment par une solution de cholestérine, dissoute ensuite dans l'éther.

5^o L'adsorption des ferments par des précipités amorphes est une méthode ancienne ; la condition essentielle de cette adsorption est que le ferment et l'adsorbant aient une charge électrique de signe contraire ; dans ce but, Michaelis et Rona ont utilisé l'émulsion de mastic pour purifier la trypsine. De plus, Michaelis et Ehrenreich ont montré que le kaolin adsorbe les corps basiques et l'alumine les corps acides. Par adsorptions et éluutions successives, Willstätter et ses collaborateurs

ont obtenu récemment des solutions pures et très actives d'invertase, d'amylase, de lipase, de tryptase, de peroxydase, d'émulsine et de maltase.

L'adsorbant peut, soit enlever les impuretés du ferment, soit l'adsorber seul.

Les ferments sont adsorbés successivement par le kaolin et l'alumine ; l'élution est réalisée par le phosphate diammonique, l'ammoniaque ou le citrate.

Pour extraire l'invertase, p. ex., la Levure est autolysée par l'acétone à une concentration de 28 % ; le ferment est ensuite adsorbé par le kaolin, puis par l'alumine et lavé avec de l'ammoniaque à 0.04 %, enfin précipité par l'acétone. Il contient encore une grande quantité de gomme de Levure dont on le sépare par une deuxième adsorption avec le kaolin ; la préparation de sucrase ainsi obtenue est très active. Le degré de purification du ferment est très important : ainsi, la sucrase obtenue habituellement est acide et précipite avec l'alumine, mais non avec le kaolin ; purifiée, elle est neutre et précipite avec l'alumine et le kaolin.

Willstätter a pu également séparer les trois ferments pancréatiques : amylase, trypsine et lipase, grâce à cette méthode. La lipase est adsorbée facilement par l'alumine hydratée en milieu acide. L'adsorbant, recueilli et traité par une solution étendue de phosphate d'ammonium, contient surtout de la lipase (90 %). En répétant cette opération, la lipase se sépare complètement. Il reste un liquide contenant la trypsine basique et l'amylase neutre. Une adsorption au kaolin entraîne l'amylase impure. Un traitement au kaolin enlève la trypsine.

Les impuretés des peroxydases sont enlevées par l'alumine, tandis que le ferment n'est pas adsorbé lui-même.

6° La filtration diminue le pouvoir du ferment retenu en partie par le filtre (Effront).

7° La séparation des éléments inorganiques a été fréquemment réalisée par dialyse. Bierry et Schaeffer ont dialysé sur sacs de collodion la lactase et l'amylase pancréatique.

Osborne fait précéder la dialyse d'une coagulation des protéiques par l'alcool.

Pekelharing soumet les solutions de ferment à des dialyses et à des auto-digestions successives pour éliminer les sels minéraux et l'azote.

Effront, Fraenkel et Hamburg ont éliminé les substances protéiques après dialyse par une méthode intéressante. S'appuyant sur les expériences de Beijerinck, ces auteurs font subir aux précipités de ferment une série de fermentations par la Levure soumise à la « faim d'azote », par culture préalable sur un milieu pauvre en cet élément. Les impuretés protéiques et hydrocarbonées sont utilisées par cet organisme tandis que les ferments : amylase, trypsine, non absorbés, sont, de ce fait, purifiés.

Remarquons que la dialyse diminue souvent plus ou moins l'activité du ferment, soit par diffusion à travers le parchemin, soit par privation du coferment nécessaire à son activité.

Ces différentes méthodes de purification ne conduisent qu'à des produits encore impurs, renfermant certaines substances étrangères que l'on n'a pu supprimer ; d'autre part, les essais de purification très poussés ou trop longs ont abouti à la transformation des ferments en formes inactives.

Willstätter a insisté tout particulièrement sur la nécessité d'effectuer, au cours de chaque préparation de ferment, un contrôle sur la valeur fermentative, se rapportant :

- a) à la quantité obtenue par rapport au matériel initial ;
- b) à la concentration du ferment dans les préparations obtenues, c'est-à-dire à son degré de pureté.

Cette mesure consiste soit à déterminer la *vitesse* de la réaction fermentative (exprimée par la constante k s'il s'agit d'une réaction monomoléculaire), soit, plus généralement, la « *valeur de temps* », c'est-à-dire le temps pendant lequel la quantité de ferment présente transforme une fraction déterminée du substrat, p. ex. 50 %.

Dans le cas des réactions monomoléculaires, on a la relation :

$$\frac{\text{Quantité de ferment}}{\text{Constante de réaction}} = \text{constante.}$$

Différents facteurs modifient le pouvoir fermentatif : température, pH, concentration du substrat, présence d'activateurs ou de paralysateurs ; d'où la nécessité de maintenir

ces facteurs rigoureusement constants pendant ces déterminations et d'effectuer des comparaisons quantitatives avec des solutions de ferments de concentrations différentes.

NATURE CHIMIQUE DES FERMENTS.

La liaison étroite de ces éléments en très petite quantité avec une masse énorme de protéïques, leur destruction à des températures voisines de celles de la coagulation des protéïques, les ont souvent fait rapprocher du groupe des protides.

C'est ainsi que Bokorny, O. Loew ont soutenu qu'ils appartaient au groupe des albuminoïdes. Cependant, ils ne présentent généralement pas les réactions caractéristiques des protéïques. L'invertase d'Osborne, d'Euler, de Willstätter, l'amylase de Fraenkel et Hamburg, de Pribram, la lipase de Willstätter et Waldschmidt-Leitz, la peroxydase de Willstätter et Pollinger, l'émulsine d'Olita n'ont donné aucune des réactions de précipitation ou de coloration des substances protéïques.

Il semblerait, du reste, que la composition chimique de ces corps est extrêmement variable. Un fait intéressant est que l'on a pu déceler la présence d'un sucre dans les ferments des polyoses : l'invertase d'Osborne, p. ex., n'a pu être complètement séparée du mannose (Koelle) ; de même celle préparée par Euler, Lindberg et Mellander ; l'amylase de Fraenkel et Hamburg contenait un pentose. Ces faits ont conduit Mathews et Glenn (1911) à considérer les ferments comme constitués par deux substances : un colloïde organique, protéïque, et un hydrate de carbone actif de même nature que le substrat attaqué.

Cependant on n'a jamais pu prouver que les deux substances : azote et sucre, étaient essentiellement liées à l'activité du ferment, et Beijerinck a montré que l'amylase ne pouvait remplacer ni les sucres, ni les matières azotées dans les milieux de culture des Bactéries. Pour Michaelis et Davidsohn, la trypsine serait identique à l' α -nucléo-protéïde d'Hammarsten, extrait du Pancréas. Cependant, Young a insisté sur ce fait, qu'injectée dans le sang, la trypsine ne donnait

naissance à aucune antitrypsine, fait contraire à l'hypothèse de sa nature protéique.

D'après Willstätter, la peroxydase serait un glucoside azoté.

Pour O. Loew, Wöcker et Maggi, ces corps présenteraient une fonction aldéhydique. E. Rona a fait des expériences de blocage de la fonction aldéhydique de plusieurs ferments : pepsine, trypsine, amylase, émulsine, invertase et maltase, mais n'a observé aucune modification de leur activité. Si ce groupement aldéhydique existe, il n'a donc aucun rôle actif.

Ayant constaté la présence constante de manganèse dans la laccase et l'inactivation du ferment par enlèvement de ce métal, G. Bertrand (1909) a énoncé une théorie de la double composition des ferments ; ils seraient constitués par l'union de deux substances : une complémentaire activante, colloïdale, et une complémentaire active, métallique : Ca, Mg, Mn ou Zn.

D'après Willstätter, la sucrase renfermerait des traces de fer, la peroxydase également.

La théorie du déséquilibre électrostatique proposée par P. Girard sera mentionnée dans la deuxième partie (p...).

Pour Willstätter, Northrop, Hugounencq et Loiseleur, les ferments, électrolytes amphotères, sont formés par un groupement carboxyle et un groupement aminogène et présentent une adsorption sélective pour certains éléments.

Hugounencq et Loiseleur ont particulièrement étudié les ferments protéolytiques : pepsine et trypsine. Ces auteurs ont montré que si l'on bloque par l'alcool le groupement carboxyle COOH de la pepsine, le ferment perd son activité. Le blocage par le formol du groupement NH_2 ne détruit pas les propriétés du ferment. On se trouve, ainsi, en présence d'un corps qui, ionisé, donne un gros micelle $\left(\overset{-}{\text{PCOO}} \right)$ et $\left(\overset{+}{\text{H}} \right)$. Dans un milieu renfermant NaCl , le micelle $\left(\overset{-}{\text{PCOO}} \right)$ adsorbera les ions $\left(\overset{+}{\text{Na}} \right)$, les ions $\left(\overset{-}{\text{Cl}} \right)$ se combinant aux ions $\left(\overset{+}{\text{H}} \right)$. Mais le groupement $\left(\overset{-}{\text{PCOO}} \right)$ peut adsorber un nombre plus grand

d'ions $\left(\overset{+}{\text{Na}}\right)$ que ne le ferait prévoir la double décomposition ; il s'ensuit que le nombre d'ions $\left(\overset{-}{\text{Cl}}\right)$ libres est supérieur à celui des ions $\left(\overset{+}{\text{H}}\right)$; c'est cet excès d'ions $\left(\overset{-}{\text{Cl}}\right)$, qui constitue les ions actifs agissant électivement sur les groupements aminés de protides.

Pour la trypsine, au contraire, le groupement actif serait aminogène. Ionisée, elle donnerait un gros micelle $\left(\overset{+}{\text{PNH}^3}\right)$ et un hydroxyle. $\left(\overset{-}{\text{OH}}\right)$. En présence de CO_3Na_2 , il y aurait adsorption de $\left(\overset{-}{\text{CO}_3}\right)$ par le groupement $\left(\overset{-}{\text{PNH}^3}\right)$. Les ions $\left(\overset{+}{\text{Na}}\right)$, en excès par rapport à H_2O joueraient le rôle d'éléments actifs attaquant les groupements acides des protides.

On voit que cette théorie, semblable en certains points à celle de G. Bertrand, s'en écarte cependant par ce fait que le colloïde du ferment intervient par son état électrique.

Nos connaissances actuelles sur la nature chimique des ferments peuvent donc se résumer aux faits suivants :

Les ferments sont des corps à poids moléculaire élevé, à l'état colloïdal, diffusant difficilement et donnant avec l'eau des hydrosols ; électrolytes amphotères, ils contiennent une fonction acide et une fonction basique et sont formés par l'association d'un support colloïdal et de sels minéraux. Il n'y a aucun rapport entre la teneur en Az et en sucre et l'activité des ferments. Il est vraisemblable que les réactions caractéristiques des albuminoïdes doivent être attribuées aux impuretés qui leur sont associées.

ZYMOGÈNES.

Ces ferments sont souvent sécrétés à l'état de zymogènes inactifs. La transformation de ces éléments en ferments actifs s'effectue sous des influences diverses : pH déterminé

pour la pepsine, présence d'électrolytes (NaCl pour l'amylase), formant avec le ferment des combinaisons complexes. L'élément activant du sel est, soit l'anion (Cl pour l'amylase), soit le cation (Ca pour la thrombase).

Dans d'autres cas, il se forme des adsorbats complexes de l'activateur avec le ferment et le substrat (sels biliaries pour la lipase). Il y aurait également lieu, dans certains cas, d'envisager le zymogène, non comme un proferment, mais comme un mélange du ferment avec une substance paralysante ; l'activation résulterait alors de la destruction ou de l'élimination du paralyseur. Un tel cas serait réalisé, d'après Wills-tätter, par l'adsorbat lipase-cholestérine ; par élution de la cholestérine, la lipase redevient active.

C'est en se basant sur de tels faits que Neuberg a proposé de rejeter le terme « zymogène » pour adopter celui « d'apoferment » ou forme inactive du ferment, les substances auxiliaires nécessaires à son activation constituant les *kinases* ou *coferments*, indépendants des activateurs ou paralyseurs des réactions.

CHAPITRE III

BIOLOGIE DES FERMENTS

LEUR ÉVOLUTION

DANS LA SÉRIE PHYLO- ET ONTO-GÉNÉTIQUE.

« Les diastases, a dit Claude Bernard, contiennent, en définitive, le secret de la vie. » De fait, leur très grande dispersion, leur très grande diversité dans le monde végétal et dans le monde animal pourraient témoigner à elles seules de l'importance qu'ils doivent avoir dans les phénomènes vitaux essentiels.

Passons donc en revue leur répartition chez les végétaux et chez les animaux.

Sans nous préoccuper de la question de savoir s'il faut ranger les Bactéries avec les plantes ou avec les animaux, éternel sujet de division entre botanistes et zoologistes, nous envisagerons successivement, pour la commodité de l'exposé:

1^o Les ferments chez les végétaux *hétérotrophes* (Molliard), élaborant leur substance propre aux dépens des substances organiques provenant d'autres êtres vivants, à savoir les Bactéries et les Champignons.

2^o Les ferments des végétaux supérieurs ou *autotrophes*, fabriquant leur matière organique directement à partir des substances empruntées au règne minéral. Entre ces deux groupes se placent les plantes parasitaires, véritables formes de transition, qui semblent, cependant, au point de vue de leur nutrition, se rapprocher plutôt du premier groupe. La distinction entre ces deux groupes n'est d'ailleurs pas absolue, puisque, chez les végétaux supérieurs même, seules les cellules chlorophylliennes sont des éléments autotrophes, tan-

dis que les cellules incolores sont hétérotrophes vis-à-vis des premières.

3^o Les ferments des animaux, suivant l'ordre de complexité croissante, chez les Invertébrés d'abord, puis chez les Vertébrés, enfin, chez l'Etre Humain au cours du développement de sa conception à son état adulte.

PHYTOFERMENTS.

1. FERMENTS DES VÉGÉTAUX HÉTÉROTROPHES.

Les microorganismes nous offrent, pour ainsi dire, l'exemple le plus frappant de cette extrême diversité des ferments chez les êtres vivants.

Envisageons, tout d'abord, les ferments des glucides.

Ferments des disaccharides.

On sait que l'hydrolyse de ces sucres par les ferments aboutit à la formation des monosaccharides dont ils dérivent.

La *saccharase* ou *sucrase*, assez répandue, est sécrétée par de nombreux Champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) et par des Levures.

Willstätter s'est proposé, récemment, d'étudier si, en l'absence de saccharase, la Levure possédait le pouvoir de dédoubler directement le sucre de canne. Il a observé qu'avec un pH très acide du milieu, d'environ 2, il semblait bien que le sucre était directement attaqué, contrairement aux conceptions classiques.

Très répandue est la *maltase* que l'on rencontre chez de nombreux Champignons (*Botrytis cinerea*, *Sterigmatocystis nigra*) et dans la plupart des Levures.

La teneur des Levures en maltase est extrêmement variable certaines n'en contenant que très peu, ou même pas du tout, la formation de ce ferment étant généralement fonction de la teneur en malt des moûts. Elle manque également chez certains Saccharomycètes (*S. Marxianus*, *S. exiguus*, *S. Ludwigii*) qui contiennent exclusivement de la sucrase. Mais, fait très curieux, le *Bacillus Subtilis* et le *Saccharomyces Ludwigii*, qui ne contiennent pas de maltase, dissocient directement, l'un l'amidon, l'autre le glycogène, en glucose.

Ferments des polysaccharides complexes.

Mais le ferment le plus répandu est incontestablement l'*amylase* qui se rencontre partout (*Streptocoque*, *Pneumocoque*, *B. subtilis*, *B. méésentérique*, *Aspergillus niger*). Il s'agit, pour les Levures, d'un ferment difficilement séparable des cellules, car ces organismes ne dissocient pas l'amidon et le glycogène contenus dans les milieux de culture, et la présence de l'amylase n'est montrée que par l'autolyse, au cours de laquelle on voit la Levure digérer son propre glycogène.

Très curieuse est l'association de ces Levures avec des Champignons sécrétant de l'amylase, association qui leur permet, ainsi, d'attaquer l'amidon sans qu'elles présentent de lésions cellulaires. Ainsi est-ce le cas pour la Levure de Koji qui fournit le soja et le také, sorte de vin fabriqué au Japon par fermentation du Riz. On a montré que, dans ce cas, l'agent actif était l'*Aspergillus Orizae* dont l' α -amylase est très active.

La Levure du Tonkin est également associée à un Champignon du genre *Mucor* qui serait une amylase.

Le *Bacillus macereus* sécrète une amylase qui ne dissocierait l'amidon que jusqu'au stade dextrine.

L'*inulase* a été signalée chez *Penicillium* et chez l'*Aspergillus Niger*, où elle a été particulièrement bien étudiée par Bosselli. Une très faible alcalinité arrête l'action du ferment à chaque température, et à chaque température correspond un optimum d'acidité.

Tout à fait spécifique est la *cellulase* ou *cytase* qui dédouble la cellulose en cellobiose et glucose. Pringsheim a montré son existence chez certains Champignons destructeurs du bois (*Merulius lacrymans*). Fréquemment aussi les feuilles d'*Elodea* présentent des érosions dues à la dissolution de la cellulose ; au cours de la germination des graines, il se produit sous l'influence des ferments, une digestion des parois cellulaires.

Zeller et Schmitz ont observé que chez les *Lenzytes* et les *Polyporus*, ce ferment apparaissait seulement dans le myce-

lium desséché et broyé. Ellenburger l'a signalé chez un Champignon fréquemment rencontré dans l'intestin des Ruminants.

Les *hémicellulases* ou *mannases* ont été trouvées chez les Monilies et les Moisissures. Pringsheim a montré que certaines Bactéries pouvaient également dissocier les mannanes en mannose.

Les *pectinases* ou *coagulases* se rencontrent chez de nombreux Champignons (Jones). On sait que les composés pectiques, très répandus chez les végétaux, entrent dans la constitution de la plupart des membranes cellulaires. Sous l'influence de la pectase, ils coagulent et se dédoublent en arabinose et galactose.

Gram a indiqué la présence d'une *gélase* chez une Bactérie trouvée dans l'eau de mer (*B. gelaticus*). Ce ferment hydrolyse la gélase et l'agar-agar, acide gélase-sulfurique, dont le poids moléculaire serait d'environ 9000, d'après Neuberg. Cette gélase contiendrait, parmi ses composants, une *sulfatase*, rencontrée uniquement chez les Bactéries et qui serait le premier agent actif d'attaque.

Ferments des glucosides.

Par hydrolyse, ces corps se dédoublent en un sucre, qui est généralement du glucose, mais parfois aussi du rhamnose, du galactose, de l'arabinose ou du xylose et un groupement prosthétique variable, dont la nature est très importante à connaître pour effectuer le classement de ces composés.

Le ferment des glucosides le plus répandu et le mieux connu est l'*émulsine* que l'on rencontre chez *Aspergillus niger*, *Aspergillus Orizae*, *Mucor*, *Penicillium Glaucum*, et chez les Champignons supérieurs.

Les Levures de brasserie et le *Bacterium coli* contiennent un ferment analogue qui dissocie l'amygdaline, la salicine, l'arbutine et l'esculine. L'amygdaline, p. ex., est dédoublée en glucose, aldéhyde benzoïque et acide cyanhydrique.

· *Ferments protéolytiques.*

Passons maintenant à un autre groupe de ferments également très répandus chez les micro-organismes, à savoir les ferments qui désagrègent la matière protéique.

L'étude des ferments protéolytiques chez les Bactéries est, en fait, extrêmement complexe, pour la simple raison qu'ils n'existent jamais à l'état isolé, mais qu'un même organisme en renferme généralement plusieurs.

Même les recherches modernes très approfondies de l'école de Willstätter, consacrées à l'étude des modes de séparation des différents ferments des Bactéries, n'ont pas donné de résultats définitifs.

Dans une étude récente, Dernby avait admis la présence, chez les Bactéries, d'un ferment peptidique analogue à l'érepsine, une *éreplase*, d'une *pepsinase* et d'une *tryplase* de pH optimum 7. Mais Willstätter a été amené à limiter les ferments de la Levure à une *éreplase typique* et à un autre ferment qui se comporterait de la même façon que la *papaïne* activée par HCN ; il attaque les protéines : fibrine, caséinogène, sérum-albumine, au pH optimum d'environ 5, et les démolit jusqu'au terme de polypeptide seulement. Détruit vers 60°, il est paralysé par la formaldéhyde à 0,5 %. Il en serait de même pour toutes les Bactéries, également pour les Champignons : Basidiomycètes et Myxomycètes.

L'autolyse du Bacille de la diphtérie (Dernby) a libéré quelques peptidases et, par broyage avec du sable, des ferments dissociant la gélatine. *Bacillus pyocyaneus*, anthrax, *fluorescens*, contiendraient un ferment dissociant l'élastine.

Les nucléines sont attaquées par des ferments spéciaux, les *nucléases*, qui les transforment en bases puriques et acide phosphorique. On les a observés chez *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Continuant l'action des nucléases, les *purinamidases* des Levures désaminent les purines, transformant l'adénine et la guanine en hypoxanthine et xanthine.

L'*asparaginase*, qui dédouble l'asparagine, a été signalée dans la Levure de bière, de saké, dans les Champignons.

On a également signalé la présence inconstante dans la Levure, de l'*arginase* dissociant la d-arginine en ornithine et urée.

L'*uréase*, observée chez les Bactéries, est particulièrement répandue chez certains Champignons de moisissures, tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, ainsi que chez les Champignons supérieurs. Elle dissocie l'urée en ammoniacque et gaz carbonique.

On a montré, chez les Bactéries, que sa formation dépendait de la composition du milieu de culture. On a observé, du reste, bien souvent, la formation adaptative de ferments variés par modifications du milieu de culture, en particulier pour *Sterigmatocystis nigra*.

Remarquons également le comportement différent de ces organismes suivant la réaction du milieu.

Ainsi Butkewisch a montré, qu'en présence de peptones, *Sterigmatocystis nigra* produit surtout de l'ammoniacque, en milieu acide, tandis qu'il se forme surtout tyrosine et leucine, si on le cultive sur un milieu rendu alcalin par un excès de carbonate de calcium. Au contraire, *Penicillium glaucum* qui, en milieu alcalin, fabrique en abondance tyrosine et leucine, produit de l'ammoniacque si on acidifie le milieu par l'acide phosphorique.

Également importante est l'influence de l'oxygène : en présence d'oxygène, *Sterigmatocystis nigra* conduit la désintégration jusqu'au stade ammoniacque ; en l'absence de ce gaz, il ne fabrique plus que des acides aminés.

Des présures ont été fréquemment signalées chez les Bactéries et les Levures.

Ferments des lipides.

On a observé fréquemment la dissociation des graisses par les Bactéries, surtout par les Bactéries pathogènes : *B. fluorescens*, *Pyocyaneus*, *Liquefaciens* (Söhngen), mais on n'a réussi à extraire les *lipases* des cellules qu'après leur destruction préalable (Avery, Michaelis). Wills les a rencontrées dans le Bacille de Koch tué.

Les Champignons inférieurs : *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus Oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Oidium lactis*, contiennent des lipases. De même dans les Champignons supérieurs (Oronge), Zellner a signalé la présence d'un ferment dont le pouvoir lipasique serait assez faible.

En Allemagne, on s'est préoccupé, particulièrement pendant la guerre, d'étudier, dans un but pratique, la formation synthétique du butyrate d'éthyle par la Levure, mais les résultats obtenus dans cette voie ne furent pas satisfaisants.

La dissociation des cires, éthers des acides gras et alcools de poids moléculaire élevé a été observée chez le Bacille tuberculeux.

L'*Aspergillus Oryzae* renfermerait une lécithase énergique.

Parmi les *phosphatases*, ferments agissant sur les éthers organiques de l'acide phosphorique, on a signalé la présence d'une glycérophosphatase chez la Levure et chez l'*Aspergillus Oryzae* (Neuberg).

La zymophosphatase de la Levure dissocie l'acide fructose-diphosphorique (Harden), mais n'agit pas dans la cellule vivante.

Harden et Robison auraient obtenu, à partir de la Levure, un ferment qui décompose le d- hexose monophosphate de Neuberg.

La Levure vivante dissocie l'acide saccharose-monophosphorique de Neuberg grâce à un ferment dont l'optimum d'action occupe une zone assez étendue à la fois du côté alcalin et du côté acide.

De l'*Aspergillus* a pu être isolé un ferment qui attaquerait la phytine, éther hexa-phosphoré de l'inosite, très répandu chez les Végétaux.

Notons également que des ferments synthétisants, des *zymo-phosphatases* d'après la terminologie d'Euler, ont pu être extraits de la Levure sèche. Ils existeraient également chez l'*Aspergillus*.

A côté de ces ferments se placent les *tannases*, ferments attaquant les éthers aromatiques.

On sait que E. Fischer et Fredenberg (1911-12) considèrent le tannin comme un éther acide du glucose, un penta-éther digallique du glucose.

Fernbach et Pottevin ont isolé, de l'*Aspergillus niger*, un ferment qui dissocie le tannin, le gallo-tannin, en acide gallique et sucre, ainsi que les acides ellagique et quercique, éléments essentiels de l'écorce du Chêne. On les rencontre également chez *Penicillium*.

L'*Aspergillus* renferme aussi, d'après Neuberg, un ferment qui dissocie les éthers phénol-sulfuriques.

Ferments oxydants.

Les *laccases* ou *phénolases*, dont la découverte remonte à Berthelot, ont été bien étudiées chez certains Champignons (*Russula*, *Lactarius*, *Clavaria flava*, *Boletus*) par Chodat et Bach. On les met facilement en évidence par section rapide du Champignon et coloration au bleu de Prusse, en particulier chez *Boletus luridus*.

On a signalé la présence d'une oxydase dans la Levure haute qui manquerait dans la Levure basse, d'après Bach. Roux l'a également décelée chez *Bacterium coli*.

La *tyrosinase* qui oxyde la tyrosine, est très répandue chez les Champignons : *Russula nigricans* et *Russula delica*, *Boletus lactarius*, *Amanita* et *Scleroderma*.

G. Bertrand a indiqué une méthode permettant de différencier phénolase et tyrosinase dans un même organisme, basée sur le fait que la laccase n'est pas détruite par précipitation à l'alcool, ni à la température de 50°, propriétés qui n'appartiennent pas à la tyrosinase.

Les Champignons renfermeraient également une *catalase*. Chez la Levure, on a observé qu'elle était surtout abondante dans les jeunes cellules et ne pouvait être libérée que par la dessiccation.

M. Leod a insisté plus particulièrement sur le rôle que jouerait ce ferment dans la respiration des Bactéries. Il a montré p. ex. qu'il était absent chez les anaérobies obligatoires et assez abondant chez les anaérobies facultatifs.

On ne le trouve pas chez les aérobies quand il y a formation d'acide lactique.

D'autre part, si dans un milieu dépourvu de catalase, on

cultive des aérobies qui ne fabriquent pas de catalase (Pneumocoque), il se forme H^2O^2 par oxydation du milieu de culture sous l'influence de la lumière. Ce peroxyde d'hydrogène amène rapidement la mort de ces organismes. Mais l'addition, à ces cultures, de tissu frais renfermant de la catalase, suffit à les protéger remarquablement contre l'action nocive de H^2O^2 .

Rappelons, pour terminer, que c'est à un ferment que R. Dubois a attribué la luminescence de certaines Bactéries marines. Ce ferment ou luciférase oxyderait une substance particulière : La *luciférine*, en oxyluciférine, corps luminescent. On sait, toutefois, que d'autres théories ont été proposées pour expliquer ce phénomène.

2. FERMENTS DES VÉGÉTAUX AUTOTROPHES.

Si important que paraisse le rôle des ferments chez les Bactéries et les Végétaux inférieurs, il ne l'est certainement pas moins chez les Végétaux supérieurs. Ne les a-t-on pas fait intervenir dans les actes essentiels de leur métabolisme : respiration, assimilation, synthèse des sucres, formation des pigments ?

Ferments des glucides.

7 L'apparition de l'amidon, de l'inuline dans la plante, résulte de la polymérisation des monosaccharides formés par inversion du saccharose, soit que ce sucre constitue le premier produit de la photosynthèse (Brown et Morris), soit qu'il se forme seulement à partir des dépôts d'amidon, constituant ainsi la forme migratrice de l'amidon ; de toutes façons, la *saccharase* intervient nécessairement dans l'utilisation de ce sucre par la plante. Ainsi s'explique-t-on qu'elle soit extraordinairement répandue dans tous les organes des Végétaux : racine, feuilles, bourgeons, fleurs, semences. Certaines racines en seraient cependant dépourvues. On a constaté de plus, que la teneur en saccharase augmentait de la racine vers les fleurs, parallèlement à la migration du saccharose.

La *maltase*, très répandue également, est généralement associée à l'amylase. Localisée dans l'embryon, elle se rencontre dans toutes les semences des céréales. Les extraits de malt n'en contiennent pas. Mais Pringsheim a isolé du malt desséché un ferment très énergique, résistant mieux aux acides que la maltase de la Levure. On l'a décelée également dans les feuilles de Pomme de terre, chez le Dahlia, la Bette et l'*Helianthemum*. Chez les Phanérogames contenant des polysaccharides dont l'hydrolyse aboutit à la formation de galactose, se trouve une *lactase*. Armstrong a réussi à séparer ce

ferment de l'émulsine des amandes amères. L'optimum de son action correspondrait au pH 4,4.

Dérivé de la vicianine, le vicianose, découvert par G. Bertrand, est dissocié par la gentiobiase. Mais les Viciées (Papilionacées) renferment un ferment spécifique : la *vicianase* qui dissocie exclusivement le vicianose en glucose et arabinose.

Plus anciennement connu et surtout mieux étudiée est certainement l'*amylase*. Découverte, pour la première fois, par Payen et Persoz (1833) dans l'orge germé, sa présence a été constatée généralement dans toutes les plantes. Observée dans les différents organes des végétaux (Sjöberg), elle existe d'une façon uniforme dans les jeunes feuilles, puis diminue ensuite au cours de leur évolution d'une façon constante. Plus rare en hiver, elle augmente en été pour disparaître à l'époque de la fanaison.

La teneur en ferment, indépendante des quantités d'amidon et de sucre présentes, diminue progressivement de la tige vers la racine ; cependant, on admet généralement qu'il ne migre pas et se forme à l'endroit même de son utilisation.

D'après Iljin, l'amylase interviendrait pour favoriser la transpiration. Les cellules superficielles des feuilles contiennent de l'amidon et une amylase inactivée. Sous l'influence d'excitants appropriés (électrolytes), peut-être par suite des variations de la concentration en ions H, cette amylase, activée, dissocierait l'amidon, d'où augmentation de la pression osmotique, courbure et ouverture secondaire des feuilles favorisant la transpiration.

La même diastase jouerait également un rôle dans la formation synthétique de l'amidon, suivant un processus inverse de l'hydrolyse, d'après De Graff. Cette synthèse se ferait à partir des sucres simples contenus dans les plantes, et la réversion de l'hydrolyse serait déterminée par la concentration en sucres. Une telle hypothèse, admettant la présence dans le même élément cellulaire, de plastes hydrolysants et de plastes synthétisants, a été vivement controversée par Maige. Se basant sur les conditions différentes exigées par les deux processus pour s'accomplir (en particulier la concen-

tration des sucres), cet auteur admet que, seule, la diastase synthétisante existerait à l'intérieur du plaste, tandis que la diastase hydrolysante serait en dehors, dans le cytoplasme.

On s'est longtemps demandé si l'amylase des semences se formait seulement au moment de la germination, ou si elle existait déjà auparavant, dans un état latent, sous forme de réserve. De récentes recherches ont montré sa présence effective dans les semences au repos sous une forme inactive, soit par suite d'une acidité défavorable, soit en raison de l'absence d'électrolytes activateurs, soit, enfin, parce qu'elle ferait alors partie d'un complexe protéidique dissocié au moment de la germination.

Or, Bach et Operin ont montré que si on fait germer des plantes dans un gaz inerte, il se produit une diminution de tous les ferments ; c'est pourquoi certains auteurs ont pensé que l'apport considérable d'oxygène au moment de la germination devait produire la dislocation des liaisons d'adsorption protéidique et libérer ainsi le ferment sous une forme active. Lintner et Luers ont donc pu parler d'une « genèse oxydative » de l'amylase à partir des protéines, dans les graines en germination.

On a montré, d'autre part, que chez les semences au repos la teneur en ferment était parallèle à la faculté germinative.

Au point de vue de la localisation du ferment dans les graines, l'embryon est tout particulièrement riche ; la sécrétion s'effectuerait au niveau du scutellum (cloison délimitant l'embryon), et pendant toute la germination on voit la quantité de ferment augmenter progressivement à ce niveau. Dans l'albumen, moins riche, la sécrétion s'effectue au niveau de l'assise protéique riche en aleurone.

L'*inulinase* ou *séminase*, constatée pour la première fois chez *Helianthus tuberosus*, hydrolyse lentement l'inuline, polysaccharide suppléant de l'amidon chez certaines plantes de la famille des Composées, des Campanulacées et des Lobéliacées.

Bourquelot et Herissey ont montré qu'il y avait plusieurs inulinases végétales, différentes pour les différentes familles : celle du Caroubier, p. ex., ou caroubinase d'Effront, digère les hémicelluloses des autres Légumineuses et des Orchidées, mais non celle du Palmier.

Mais si on dépolymérise l'hémicellulose des graines de *Phytelephas* par H^2SO^4 , après neutralisation, il y a dislocation par le ferment.

L'embryon des graines sécréterait une *cytase*. Pringsheim et Karrer ont signalé la présence, dans la plupart des semences, d'une *lichénase* localisée à la fois dans l'embryon et l'albumen. Ce ferment dissocie la lichénine ou amidon des Algues en donnant du cellobiose, lequel cellobiose est, à son tour, dédoublé par la *cellobiase* des Champignons. Brown et Morris ont signalé la présence de cette lichénase chez l'Orge germé et dans toutes les semences.

D'après Bourquelot, le malt germé dissocie les substances pectiques même coagulées. Cette fermentation serait l'œuvre d'une *pectinase* présente également dans les fruits.

La gélification, ou formation de gelée, serait l'œuvre d'un ferment spécial : la *pectase*. On admet généralement que cette coagulation se produit par élimination d'un dérivé de la pectine : l'acide pectique, sous forme de sel calcaire, d'après Ehrlich. Ce ferment, assez répandu, existe dans les organes de la Carotte, de la Betterave. G. Bertrand et Mallèvre ont mesuré le pouvoir d'attaque de certains sucres cellulaires vis-à-vis des composés pectiques par le temps nécessaire pour amener la gélification d'une solution de pectine à 20 %. Le Trèfle s'est montré le plus actif et, dans l'ordre décroissant suivant, viennent Carotte, Vigne et Tomate.

Les fruits de *Rhamnus infectoria* contiennent un glucoside : le xanthorhamnoside. L'hydrolyse de ce composé, réalisée par un ferment particulier contenu dans les semences de ce végétal, aboutit à son dédoublement en Rhamnétine (Méthylquercitine) et un trisaccharide, le rhamninoase.

Ferments des glucosides

L'*émulsine* serait un mélange complexe de nombreux ferments. Son action essentielle, à savoir : la dissociation de l'amygdaline, est attribuable à trois ferments agissant successivement, d'après Armstrong.

1° L'*amygdalase* qui sépare de l'amygdaline, le gentiobiose,

disaccharide formé par dédoublement d'un trisaccharide, le gentianose, en gentiobiose et fructose. A son tour, le gentiobiose est dédoublé en deux molécules de glucose par la *gentiobiase* décelée dans les amandes amères.

2° Une β -*phénolglucosidase* ou *prunase*, qui sépare du résidu phénolique la d-benz-aldéhyde-cyanhydrine ou prunasine d'Armstrong.

3° La *d-oxynitrilase* ou *benzylcyanase*, qui sépare l'acide cyanhydrique de ce corps.

Outre ces ferments, on a décelé, dans la préparation d'émulsine, la présence d'une *lactase* (Armstrong), d'une *galactoraffinase*, d'une *cellobiase* faiblement active (Fischer) et d'une *amylase*.

On a, d'une façon générale, rapproché de l'amygdaline tous les glucosides dissociés par l'émulsine et admis l'existence de ferments spécifiques dissociant les glucosides non attaqués par l'émulsine. Mais on conçoit facilement, qu'étant donnée la complexité de la préparation dénommée émulsine, toute cette classification devrait être révisée. D'autant plus que les différents constituants de l'émulsine peuvent exister individuellement ; c'est le cas, en particulier, pour la prunase, beaucoup plus répandue que l'amygdalase dans le règne végétal.

L'amygdaline est dissociée dans tous les organes des Rosacées, des Orchidées, des Légumineuses, des Euphorbiacées et des Composées.

Rosenthaler a observé la synthèse et le dédoublement des oxynitriles chez de nombreuses plantes, en particulier *Pangium Edule*, *Hydnocarpus*, *Laurocerasus*, sans qu'il y ait dissociation d'amygdaline, fait que l'auteur attribue à la présence unique, chez ces végétaux, de l'oxynitrilase.

Chez de nombreuses Graminées, il a seulement pu déceler la présence d'HCN libre qui ferait, vraisemblablement, partie de combinaisons aldéhydiques et cétoniques facilement dissociables.

Etudiant la localisation de l'oxynitrilase dans les tissus, Rosenthaler l'a observée dans le parenchyme en même temps que l'amygdaline. On serait donc en droit d'admettre là aussi une inactivation temporaire par liaison adsorptive du

ferment ; il deviendrait actif par modification de la perméabilité cellulaire à l'intérieur des cellules.

La gaulthérine, éther méthylique de l'acide salicylique (Karrer) est dissociée à la fois par l'émulsine et par un ferment spécifique que l'on rencontre chez *Betula*, *Spiraea*, *Monotropa*, *Hypopitys*, *Gaultheria procumbens*. Ce ferment dédouble également la spiréine de quelques Spirées.

Un ferment particulier à quelques espèces, la *thioglucosidase* ou *myrosinase*, agit d'une manière spécifique sur les thioglucosides avec mise en liberté de sénévols (Bussy.) Ce ferment, qui contiendrait, outre une thioglucosidase proprement dite, une *sulfatase*, est localisé dans les cellules spéciales des semences et les organes d'un certain nombre de Crucifères, dans les parties aériennes et les semences de quelques Résédacées, dans les semences des Tropaeolacées et de quelques Violacées.

Ferments protéolytiques.

Si les auteurs classiques admettaient généralement avec Vines que les phytoprotéases extraites des Végétaux étaient constituées par des mélanges de pepsinases (Gonep-Besanez) et de peptidases, plus rarement de tryptases, les belles recherches de Willstätter devaient ébranler profondément ces notions. Cet auteur a bien montré qu'il n'y avait lieu d'admettre, chez les Végétaux, que deux types de ferments protéolytiques, à savoir :

1° Des *peptidases* ou *épreptases vraies*, dissociant exclusivement les polypeptides en acides aminés libres. Ces ferments seraient particulièrement actifs dans les semences germées (Abderhalden). Les fruits des Cucurbitacées, l'Ananas, dissocient faiblement la leucylglycine et la glycylglycine.

2° Une protéase particulière, la *papaine* ou *papayotine*, extraite du fruit et du suc de *Carica Papaya*. Cette protéase, dont l'action est très particulière (Voir p. 11) a son activité maximale au pH de 5 ; elle est activée considérablement par l'acide cyanhydrique.

Un autre ferment, la *broméline* de Chittenden, présente dans

l'Ananas, se comporte de la même manière. Elle est également activée par HCN, et aussi par H²S, mais son pouvoir est plus faible que celui de la papaïne-HCN.

Les sucres de Figuier, de Chélidoine, renferment des protéases analogues.

Willstätter a spécialement étudié la protéase de la Courge, qui se comporte différemment. L'optimum de réaction, variable, correspond à une faible alcalinité pour la gélatine faiblement attaquée et à une faible acidité pour la peptone fortement attaquée. HCN ne l'active pas, mais H²S la paralyse.

Des protéases de ce genre se rencontreraient dans toutes les plantes alimentaires, sauf Oignon et Radis.

D'après Vines, les semences au repos et en germination renferment des éreptases et des pepsinases insolubles qui attaquent la fibrine, plus énergiquement dans les graines oléagineuses.

Le phénomène est toutefois moins actif chez les graines au repos. Le PH optimal serait d'environ 4,5.

Palladine a étudié l'influence du phénomène respiratoire sur la dégradation des protéines chez les graines. Mesurant la consommation des protéines en présence ou en l'absence d'oxygène, cet auteur a observé qu'en présence de ce gaz, la quantité de protéines dédoublées était 7 fois plus grande au bout de 24 heures et 2 fois plus grande encore au bout de 3 jours. De plus, en présence d'O, il se forme surtout de l'asparagine, mais en son absence, ce sont surtout leucine et tyrosine qui apparaissent, et l'asparagine ne se forme alors que secondairement, à partir des acides aminés. On peut admettre qu'elle résulte d'une oxydation des acides aminés provenant de la démolition des substances protéiques. Cette formation de l'asparagine chez les végétaux serait donc comparable à la formation d'urée, à partir du carbonate d'ammonium, chez les animaux.

Iwanoff a montré, par dosages comparatifs du phosphore organique et du phosphore minéral, que les nucléoprotéides constitutifs du végétal pouvaient également être dégradés. Tandis que le phosphore minéral est passé au bout de 20 jours de 11 à 80 % du phosphore total, le phosphore organique a diminué de 26 à 5 %.

Doit-on admettre, en outre, la présence chez les Végétaux, de véritables ferments coagulants, de *phytochymosines*? Les auteurs modernes ont tendance à soutenir que cette action coagulante doit être attribuée, en réalité, aux protéases; il n'y aurait donc pas de chymosines végétales spécifiques, bien que la plupart des végétaux aient un pouvoir coagulant effectif comme P. Javillier l'a constaté chez *Carica Papaya* (suc), *Gallium Verum* (graines), Figuiers, Pois, Lupin, Ricin (graines) et chez la plupart des Phanérogames (feuilles).

Parmi les *amidases*, l'*asparaginase*, l'*arginase* et les *uréases* sont très répandues chez les Phanérogames, surtout dans les semences. Il semble que ces ferments, jouent un rôle important dans le métabolisme protéique de la plante. On peut supposer que, sous l'influence des protéases et des éreptases, la dégradation de la molécule protéique complexe aboutit à la formation d'arginine qui, sous l'action de l'arginase, est dissociée en urée et ornithine. Cette urée, non éliminable par le végétal, est dédoublée à son tour par l'uréase, en ammoniacque et gaz carbonique. L'ammoniacque, fréquemment constatée dans l'autolyse des semences, est utilisée pour de nouvelles synthèses. Ainsi s'explique la grande richesse des Légumineuses en uréase, en rapport avec leur teneur très élevée en albumines.

L'*uréase* du Soja (*Glycine hispida*) a été particulièrement étudiée. L'optimum de température est à 55°. Armstrong a observé une action nuisible de O sur la fermentation, tandis que CO² agissait favorablement, vraisemblablement en jouant le rôle de tampon. Les combinaisons organiques d'arsenic paralysent le ferment, de même que les sels de métaux lourds, par formation de complexes réversibles, d'après Euler. Jacoby a observé que le cyanure de potassium et les acides aminés faisaient disparaître cette paralysie en éliminant les métaux du complexe. Cet auteur a montré que les métaux, en poudres fines, eux-mêmes, formaient avec le ferment des complexes assez stables, des « zymogènes artificiels », dissociables par l'acide cyanhydrique. Il se forme alors des complexes cyaniques métalliques.

D'après Jacoby, tout autre serait le rôle des amino-acides : il s'agirait d'*auro-uréases*, ayant une action spécifique directe

sur le ferment, tandis que Rona pense qu'ils modifient simplement le pH du milieu.

Très intéressante, au point de vue des phytoprotéases, serait l'étude des plantes insectivores, qui n'a fourni jusqu'ici que peu d'indications précises. L'observation de ces plantes n'est pas nouvelle, puisque Darwin avait déjà établi que leur suc était capable de dissocier l'albumine. Dernby, qui a récemment étudié la *Drosera* (*Drosera Rotundifolia*), a admis la présence, chez ce végétal, d'une protéase qui, à un pH optimal d'environ 5, attaquerait les acide-albumines.

La *Pinguicula* renfermerait une tryptase disloquant le caséinogène à un pH optimum de 8-9.

Pour les autres plantes carnivores, telles que *Népenthès*, *Utricularia*, on admet généralement que la dissociation des protéines est l'œuvre des Bactéries (R. Dubois).

Lipases végétales.

Très répandues dans les semences, les lipases ont été particulièrement bien étudiées dans la graine de ricin. De cette graine a pu être extrait un ferment insoluble dans tous les solvants (Nieloux), agissant au pH optimum de 5 et différent, par conséquent, de la lipase pancréatique.

Connstein, Hoyer et Wartenberg ont bien montré que ce ferment dissociait très activement et presque intégralement les graisses neutres. Il est inactif chez les semences au repos. Les auteurs ont rapporté cette inactivité au fait que, dans ce cas, la réaction est neutre, et ils ont attribué son activation au moment de la germination à l'acide lactique formé.

Mais Willstätter et Waldschmidt-Leitz, reprenant cette étude, ont admis que :

1° Au repos, le ferment ferait partie d'un complexe protéines-ferment. Par adsorption, le ou les constituants actifs du ferment sont paralysés.

2° Pendant la germination, l'état du ferment est modifié. Les agents activants précipitent les protéines facilement éluables du complexe et la formation de sels précipités aurait une action activante sur le processus fermentatif.

Quant à l'acide lactique, activateur incontestable, il aurait un double rôle :

d'une part, il déplacerait le pH du milieu ;

d'autre part, il agirait directement sur la lipase de manière à étendre sa zone d'action même en milieu neutre, et l'on constate bientôt que le rapport $\frac{\text{action en réaction acide}}{\text{action en réaction neutre}}$ devient constant.

Willstätter attribue, de plus, l'activation pendant la germination, à une fermentation préalable des protéines par les protéases contenues dans les semences, fermentation qui aurait pour but de libérer le ferment de l'adsorbat protéines-ferment. Mais cet auteur a aussi insisté sur le fait que la lipase de germination ou « blastolipase », insoluble, est différente de la lipase des graines au repos ou « spermatolipase ».

L'action de la blastolipase, stade intermédiaire du ferment des semences, diminue progressivement au cours de la germination. Son pouvoir lipasique sur les graisses est considérable ; 80 à 85 % d'acides gras sont libérés à partir de l'huile (Green). Moins les éthers ont d'affinité pour l'eau, mieux ils sont dissociés. Cette blastolipase aurait également un pouvoir synthétique fort.

Dans les préparations dégraissées, la lipase des graines est rapidement détruite en solution aqueuse (Nieloux). Cette destruction, retardée par les acides, est accrue par les alcalins.

Détruite à 60°, la lipase de Ricin résiste à des températures supérieures à 100° en solution huileuse. L'optimum de température est à environ 35°. Certains sels paralysent le ferment (NaCl, NaF), d'autres l'activent (sels de Ca). La formaldéhyde, l'alcool et la glycérine le rendent inactif.

A côté des lipases se place la *chlorophyllase* qui, d'après Willstätter, séparerait le phytol de la chlorophylle.

Ferments oxydants.

Les *oxydases* sont, comme partout, très répandues chez les végétaux.

Étudiée par G. Bertrand, P. Fleury, la laccase, contenue dans le suc laiteux de l'arbre à laque (Yoshida), oxyde le suc

jaune de l'écorce (laccol) et le transforme en une laque noire, brillante et insoluble dont on connaît l'utilisation industrielle. Elle se rencontre également dans plusieurs espèces du genre *Rhus*. La laque du Tonkin se forme également par oxydation du laccol.

C'est aux oxydases qu'est due la coloration naturelle des fruits, le noircissement des feuilles. Les Pommes de terre (Falk), les Betteraves, les Tomates, la gomme arabique, le suc de caoutchouc, l'Euphorbe, la Chélidoïne, contiennent des phénolases. Le Raifort est tout particulièrement riche (Willstätter). Dans les semences se trouveraient seulement des *peroxydases*.

La *tyrosinase* est assez répandue, d'après Begemann, malgré l'existence assez rare de mélanines chez les végétaux.

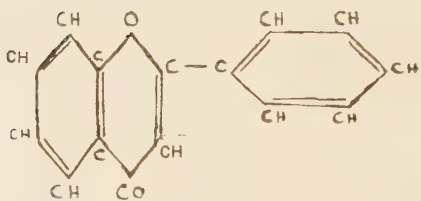
Elle se rencontre chez les semences, même au repos, et augmente pendant la germination. L'embryon en contient 30 fois plus que l'albumen.

Nous voudrions insister particulièrement sur le rôle spécial attribué par certains auteurs aux oxydases dans la formation des pigments chez les Végétaux.

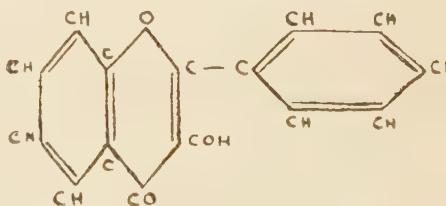
On sait que les pigments végétaux peuvent se diviser en deux groupes, d'après leur constitution chimique : les pigments jaunes d'une part ;

les pigments rouges, bleus et violets d'autre part.

Dérivés des flavones sont les pigments jaunes. Les flavones, composés phénoliques, sont caractérisés par la présence, dans leur molécule, d'un noyau benzénique soudé à un noyau pyrone, relié lui-même latéralement à un deuxième noyau phénol, suivant les schémas suivants :



Flavone.



Flavonol.

En se combinant à des sucres, ces composés forment des

glucosides, tels que le quercitrin (quercitrine + rhamnose), du Quercitron, des baies de Nerprun, du thé ; la fustine (fisétine + rhamnose) du *Rhus Cotinus* ; l'apiïne (apigénine + apiose) du Céleri. Kostanecki a pu reconstituer, par synthèse la plupart de ces colorants naturels.

Les pigments anthocyaniques, rouges, violets ou bleus, se rattachent également, d'après Willstätter, à un noyau benzopyrone, dans lequel le groupe CO serait remplacé par le groupe CH. Ils dérivent tous de trois anthocyanidines : la pélargonidine, la cyanidine et la delphinidine qui, en se combinant avec 1 ou 2 molécules de sucre (glucose, galactose, rhamnose), identiques ou différentes, forment des glucosides tels que la pélargonine du *Pelargonium zonale*, la cyanine du *Bluet*, la chrysanthénone, la kéracyanine des cerises, la violanine de *Viola tricolor*, l'œniné, la malvine...

Notons que la couleur de ces anthocyanes varie avec la réaction du suc cellulaire : rouge quand il est acide, violet quand il est neutre, bleu s'il est alcalin. Ainsi, la Rose et le *Bluet* doivent leur coloration au même anthocyane.

Le mode de constitution de ces deux groupes de pigments montre qu'ils sont étroitement liés l'un à l'autre.

C'est ainsi que la réduction par H naissant, des dérivés flavoniques conduit à des anthocyanes ; inversement, des anthocyanes on peut passer aux flavones en oxydant par H_2O_2 (Combes, Willstätter, Zechmeister). C'est pourquoi on a attribué aux ferments oxydo-réducteurs la formation de ces différents pigments grâce à l'apport de l'O dans le phénomène respiratoire.

Zymases végétales.

Stoklasa aurait observé chez diverses Phanérogames : Navets (feuilles), Pois, Orge germé, une fermentation alcoolique aboutissant plutôt à la production d'acides lactique et acétique que d'alcool. Le même phénomène s'observerait chez des Végétaux tués. A vrai dire, on ne sait pas encore avec certitude s'il faut rapporter ce fait aux végétaux eux-mêmes ou à des Bactéries. Bodnar a également signalé, à côté de la *zymase*, une *carboxylase* et une *cozymase* différentes de celles de la Levure.

ZOOFERMENTS

La richesse en ferments des Invertébrés, l'analogie curieuse de ces ferments avec ceux des végétaux, leur extrême dispersion dans tous les organes des êtres supérieurs, telles sont les caractéristiques les plus frappantes de l'étude des ferments dans le monde animal. Nous étudierons successivement leur répartition :

1^o chez les Invertébrés.

2^o chez les Vertébrés.

I. — FERMENTS DES INVERTÉBRÉS.

L'étude précise de ces ferments au point de vue de leur activité, de leur mode d'action n'ayant pas été faite jusqu'ici, nous nous contenterons d'envisager simplement leur présence chez les êtres inférieurs.

Ferments des glucides.

La dissociation du saccharose est-elle réalisée par les Invertébrés ? Les recherches faites à ce sujet ont montré que cette dissociation était effectuée par les Echinodermes (Etoile de mer, Oursin), par certains Mollusques (Hélix, Huitre), par les Arthropodes (Astacus, Abeille, Guêpe, Coléoptères, Chenille). Le ferment se retrouverait même dans le miel des Abeilles. Mais d'après les récents travaux de Kuhn, il y aurait lieu de distinguer dans le groupe indivis des *saccharases* deux ferments : une *fructosaccharase* et une *glucosaccharase* attaquant sélectivement l'un ou l'autre groupement de la molécule de sucre, bien que substrat et produit final restent les mêmes. D'après cet auteur, la saccharase des Invertébrés, tout comme celle de la Levure, serait une fructosaccharase. On a décelé ce ferment dans la salive et le suc intes-

tinal des Echinodermes, des Molluques terrestres et marins et d'un certain nombre d'Arthropodes.

Plus répandue est la *maltase* que l'on rencontre déjà chez les êtres les moins différenciés : les Amibes, mais plus particulièrement chez les Mollusques et chez un certain nombre d'Arthropodes : Ver de farine, Chenilles, Mouches, Larves de Mouches.

Bierry et Giaja ont signalé la présence d'une *lactase* analogue à celle de la Levure chez *Helix Pomatia*, qui dissocierait la lactosazone. Strauss l'a décelée chez les Insectes (Larves de Bombyx, Calliphora, Ver de farine).

D'autres sucres sont également dissociés par les Invertébrés : le raffinose par les Mollusques (*Helix*) et les Arthropodes (*Astacus*, Chenilles, Larves de Mouche).

Mais le ferment le plus répandu est certainement l'*amylase*. On a pu constater une digestion de l'amidon en grains et de l'empois chez les Protozoaires (Myxomycètes, Plasmodies, Infusoires, Spongiaires), chez les Echinodermes (Oursin, Holothurie, Etoile de mer) ; chez les Mollusques, ce ferment, est généralement sécrété par le gésier (*Sépia*, *Sycotypus*, *Patella*), par la muqueuse intestinale (*Huitre*, *Sépia*), par le foie ou l'estomac (*Helix*, *Limax*) ; il existe également chez les Vers, en particulier les parasites (*Taenia*, *Distoma*, *Ascaris*, *Echinorhyncus*, *Lombric* qui digère amidon et glycogène), chez les Arthropodes (*Astacus*, Scorpion, Araignée, Scarabé, Blatte, Cigale, Abeille, Bombyx, *Melolontha*, Larves de Mouche) ; la sécrétion s'effectue généralement dans le jabot, les glandes salivaires (*Dixippus morosus*) ou l'intestin.

L'*inuline* est dissociée seulement chez les Arthropodes (*Cloporte*, *Epeira*, *Hanneton*, Larve de Bombyx).

La *cellulase* est présente chez les Mollusques (*Helix*, *Limax*), dans le gésier, l'intestin ou l'hépto-pancréas. La cellulase de l'Escargot attaque la cellulose de la Betterave en donnant hexoses et pentoses, des semences de Lupin, des grains de Café, dédoublée en mannose et galactose.

Mais elle n'agit ni sur le coton ni sur le papier.

La lichénine est dissociée par la *lichénase* d'*Astacus* (hépto-pancréas).

D'autres polysaccharides complexes, les pentosanes, sont

aussi dédoublés par les Invertébrés. C'est ainsi que la *xilanas* des Mollusques (Hélix) et des Arthropodes (Larves de Coléoptères) sépare des xilanes un pentose : le xilose.

L'*amygdalase*, très répandue chez les Invertébrés, a été constatée chez tous les Mollusques et chez un grand nombre d'Arthropodes : Araignée, Larve de Fourmi, Hanneton, Cloporte.

Ferments protéolytiques.

Bien plus répandus encore sont les ferments protéolytiques ; toutefois il semble bien que l'on n'ait pu déceler nulle part de véritables protéases analogues à la tryptase ou à la pepsinase.

Par contre, d'après Abderhalden, les peptidases sont sécrétées par tous les Invertébrés : les ferments trouvés ne se différencient que par la position de l'optimum de réaction, tantôt alcalin, tantôt acide. On a constaté leur présence aussi bien chez les organismes très rudimentaires, l'Amibe p. ex., que chez les plus compliqués, les Insectes. Chez les Protozoaires, l'action se fait, soit en milieu acide (*Pelomyxa*, *Stylonychia*, *Paramecium*), soit en milieu alcalin (*Noctiluca*, *Actinosphaerium*), soit aussi bien en milieu acide qu'en milieu alcalin (Amibe, Plasmodies). Chez les Métazoaires, la réaction est tantôt acide, tantôt alcaline, tantôt neutre : acide chez les Cœlentérés (*Hydra*, Méduse, *Rhizostoma*), chez certains Vers (*Lombricus*, *Hirudo*, *Rhizostoma*), chez quelques Mollusques (*Chiton*, *Aeolis*, sang de l'Huitre), mais plus généralement alcaline, chez les Spongiaires (*Reniera*, *Tedania*), les Vers (*Nereis*, *Arenicola*, *Aphrodite*, Tuniciers), les Echinodermes (*Echinides*, *Stellerides*, Astérie), les Mollusques (foie de l'Huitre, Céphalopodes, glandes salivaires postérieures de l'Octopus), et surtout chez les Arthropodes (foie de Scorpion, intestin moyen des Phalangidés, Mouches, Larves de Mouche, Ver de farine, Chenilles), enfin neutre ou indifférente chez certains Spongiaires (*Subérites*, *Chondrosia*, *Geodia*, *Hircinia*), les Cœlentérés (*Actinia*, *Hydra*), les Echinodermes (Astérides), les Arthropodes (glandes salivaires estomac, intestin moyen de Scorpion).

Ces ferments ont une action extrêmement faible ou même nulle sur les protéines vraies ; ils n'attaquent pas du tout l'ovalbumine, mais seulement la gélatine.

Parmi les *amidases*, l'arginase a été décelée chez *Helix*, *Lombricus*, *Hirudo* et *Astacus*.

La *chymosine* a pu être décelée chez les Spongiaires (Subériles), les Coelentérés (Actinie), les Echinodermes (Sphaerechinus), les Mollusques (Octopus), les Vers (Sipunculus), et les Arthropodes (Epeira, Buthus).

Ferments des lipides.

La *lipase*, assez répandue, est sécrétée par les Spongiaires, les Coelentérés, qui digèrent huile d'Olive et monobutyrique, les Vers, les Mollusques : Mollusques marins du Pacifique, Huitre, Patella, Sycotypus, Limax, Helix. Sa présence n'a pu être démontrée ni chez les Protozoaires, ni chez les Arthropodes ; elle est douteuse chez les Echinodermes.

Ferments oxydants.

Il semble que les *phénolases* ne se rencontrent pas d'une manière générale chez les Invertébrés (Meyer), sauf, d'une façon constante, chez les leucocytes et les cellules sexuelles des Echinodermes.

Par contre, très répandue est la *catalase*, en raison, sans doute, de ses relations présumées avec la fonction respiratoire. Décelée dans l'intestin des Vers (Ascaris), on a observé sa présence (Zieger) chez les Mollusques (Helix, Limax).

II. — FERMENTS DES VERTÉBRÉS

A part quelques ferments particuliers aux organismes inférieurs : Bactéries, protistes, et aux Végétaux, la plupart des ferments connus se retrouvent chez les êtres supérieurs. Seule, varie leur répartition dans les différents organes.

C'est pourquoi nous nous occuperons plus spécialement pour chaque ferment, selon l'ordre précédemment adopté, de sa localisation, en signalant les animaux chez lesquels il est absent.

Ferments des glucides.

Ferment spécifique de l'intestin est la *saccharase* ou *invertase*, mise en évidence par Cl. Bernard dans un extrait de muqueuse. Absente chez les Bovidés (Fischer), elle se rencontre généralement chez les autres Vertébrés, dans tout l'intestin, car on a pu la déceler encore dans toutes les parties du colon.

Certains auteurs ont encore voulu admettre sa présence dans les leucocytes, dans l'autolysat du cerveau.

Dans le sang, elle manque normalement, mais une injection de sucre la fait apparaître, et de plus, la présence de saccharose la protège contre une destruction rapide.

C'est à Von Mering que revient le mérite d'avoir montré la dissociation, par le pressis de pancréas, du maltose en deux molécules de glucose. Dans la salive, on a généralement admis que la maltase accompagnait l'amylase. Mais son lieu d'élection est incontestablement l'intestin : c'est l'intestin de Porc qui est le plus riche en ce ferment, très rare par contre chez les Bovidés. Le duodénum est particulièrement riche en ferment, tout au moins chez le Porc et le Lapin. Chez les Carnivores, les différentes parties de l'intestin en renferment sensiblement la même quantité. Dans les autres organes, elle est généralement associée à l'amylase. C'est ainsi qu'on la rencontre dans le sang, les globules, la lymphe, l'urine, la sueur. C'est encore le sang de Porc qui est le plus riche en

ferment ; puis viennent, dans un ordre décroissant (Compton), Chien, Bovidés, Cheval.

L'autolyse a également révélé sa présence dans le cerveau.

On a admis d'une manière générale que la sécrétion de *lactase* était l'apanage de l'intestin des jeunes êtres (Veau, Chien, Nourrisson) ; cette sécrétion serait influencée par l'alimentation, car elle subsiste chez les jeunes soumis à une alimentation lactée prolongée. Toutefois, cette adaptation à l'alimentation serait, d'après Plimmer, particulière aux Carnivores et aux Omnivores et ferait défaut chez les Herbivores. Le fait certain est que le lactose est exclusivement dissocié dans l'intestin car le ferment n'a jamais été rencontré ailleurs. R. Plimmer et J.-L. Resedale l'ont cependant décelé dans le jabot de poulet. La bile, d'après Frouin, exercerait une action activante sur ce ferment.

La dissociation du tréhalose n'est effectuée que par un seul vertébré : la Carpe, dont le sang possède une *tréhalase* spécifique.

Tout à fait particulière aux Invertébrés et aux Végétaux est la dissociation des trisaccharides, car elle n'a jamais été réalisée par aucun Vertébré.

Mais nous retrouvons dans toute l'échelle animale le ferment universellement répandu qu'est *l'amylase*, non seulement dans le tractus digestif, où elle est particulièrement abondante, mais aussi dans tous les organes et même dans toutes les cellules : rate, rein, foie, cerveau, nerfs, ovaire, hypophyse, vagin, placenta, glande mammaire ; et Przylecki a même signalé sa présence dans la peau chez la Grenouille, Sexsmith et Petersen dans la peau du Porc, du Poulet, du Chat, du Cobaye, du Lapin et de l'Homme. H. Roger a étudié particulièrement l'amylase du jaune d'œuf. Chez l'homme et le Singe, seule, la salive est très riche en amylase. Parmi les Omnivores, seule la salive de Porc renferme ce ferment. Les Carnivores et les Herbivores en sont également dépourvus, de même les Rongeurs (Lapin) ; cependant on admet sa présence dans la salive du Rat et de la Souris. Chez les Poissons, l'amylase salivaire manque également, et si elle existe dans la salive des Reptiles et des Amphibiens, son pouvoir est très faible. Donc, seulement chez l'Homme, le Singe et le

Pour il y a digestion buccale de l'amidon. Chez les Herbivores, la digestion des amylacés s'opère grâce à la haute teneur des aliments végétaux en amylase, qui est donc exclusivement d'origine exogène.

La digestion salivaire se poursuit-elle dans l'estomac ? Bien que l'on ait généralement pensé que cet acte était impossible par suite de l'acidité du contenu gastrique, Wolgemuth a observé qu'elle se produit bien en réalité tant que la formation d' HCl n'a pas augmenté notablement la concentration en ions H , condition défavorable pour l'activité du ferment. Nous étudierons dans la seconde partie le mécanisme d'action de ce ferment.

Egalement importante est la part de l'amylase pancréatique dans la digestion des amylacés. D'après Grüntzner, elle n'interviendrait que tardivement, 14 à 16 heures après le repas, et pour Hirata, sa sécrétion dépend étroitement de l'alimentation : p. ex., chez des Rats nourris au foin, la sécrétion produite était de 300 à 500 fois plus importante que chez des Rats nourris au lard. D'après Meyner, chez l'Homme, l'introduction d'acide l'accroît, celle de bicarbonate de soude la diminue.

Bien plus importante doit être considérée l'action de l'amylase intestinale, puisqu'elle se rencontre chez tous les Vertébrés, même chez les animaux à sang froid. D'après Wolgemuth, chez le Chien, son lieu électif de sécrétion serait le duodénum.

La teneur en ferment serait jusqu'à un certain point seulement indépendante de l'alimentation, car à la suite de l'introduction directe d'amidon au contact de la muqueuse intestinale, le suc sécrété serait plus riche en ferment.

Parmi les organes, il semble bien que le foie possède le pouvoir amylolytique le plus marqué. Dick et Holenberg ont réussi à séparer des cellules hépatiques un ferment actif dont le pH optimum serait de 6,9. Ce ferment serait normalement adsorbé par les colloïdes cellulaires et sa mise en activité résulterait de l'élution, par différents facteurs, des substances adsorbées.

L'étude de la destruction post-mortem du glycogène par le ferment glycolytique a montré qu'elle suivait la loi mono-

moléculaire. L'acidification produite au début de l'autolyse l'active en abaissant le pH normal des tissus. Chez les animaux à sang froid (Grenouille), l'activité fermentative subit généralement l'influence de la température ; aussi, la destruction du glycogène se fait-elle spontanément en été.

On sait que le pancréas exerce une action activatrice sur la glycolyse (Hédon, Bang, Zegla), diminuée chez les animaux dépancréatés. Issekuty a bien montré qu'il fallait attribuer cette action à l'insuline, car l'injection d'insuline chez une grenouille dépancréatée amène au bout de 15 à 23 heures la dissociation du glycogène.

D'après Oppenheimer, la régulation du métabolisme du sucre dans l'organisme serait assurée grâce à trois mécanismes :

1^o La régulation de la concentration en ions H, l'optimum de réaction du ferment hépatique correspondant à un pH de 6,9, régulation où peuvent intervenir les sels neutres.

2^o L'influence des facteurs agissant sur le complexe d'adsorption cellulaire : ferment-protéines, facteurs intervenant, soit pour augmenter l'adsorption et paralyser le ferment (privation d'eau), soit pour diminuer l'adsorption et libérer le ferment (activation par alcool éther).

3^o La sécrétion d'adrénaline, déclanchée par excitation du splanchnique ; elle agirait en détruisant les liaisons adsorptives superficielles du ferment, d'où sa mise en liberté temporaire. Un choc sur la nuque ou une excitation du vague activerait également la production de sucre ; le sympathique aurait une action permanente, « tonus du sucre », sur la production du sucre.

D'après Oppenheimer, l'insuline ne devrait pas être considérée comme une hormone véritable, mais comme un co-ferment. Les troubles du métabolisme des sucres seraient dus, non à une diminution de leur oxydation, mais simplement à une modification des conditions d'activité du ferment glycolytique.

L'émulsine n'a jamais été signalée chez les animaux supérieurs. De plus, en ingestion buccale, elle est toxique, surtout chez les Herbivores.

La production d'acide cyanhydrique, observée par Auld chez les Ruminants, serait attribuable à des Bactéries.

Par contre l'*inulinase* se rencontre normalement dans les organes et dans l'intestin. Tschermak a signalé sa formation chez le Lapin après ingestion d'inuline ; chez le Chien, dans les mêmes conditions, elle n'apparaît pas.

Ferments protéolytiques.

La plus répandue des protéases est incontestablement la *trypsine pancréatique*. Toutefois, son existence n'a pu être prouvée d'une façon certaine chez les Poissons, où le pancréas est assez mal individualisé. Chez les Sélaciens, pourvus d'un véritable pancréas, la tryptase serait activée par la rate.

La tryptase du sang, différente du ferment pancréatique, proviendrait des leucocytes ou des organes. (Steppuhn et X. Utkin-Ljobowzow). L'urine normale n'en contient que des traces. Chez le lapin, ce ferment, d'après Falkenhauser, ne digérerait pas la fibrine d'un lapin de même race.

La *pepsine*, spécifique de l'estomac, n'existe pas chez les Poissons. Ceux-ci n'auraient qu'une *protéase gastrique* analogue aux protéases d'organes, agissant à un pH optimal de 3.

Parmi les peptidases, l'*épepsine* intestinale dissocie énergiquement les polypeptides. Waldschmidt-Leitz, a, en outre, extrait de la pancréatine, une peptidase pure et active. D'après Abderhalden, les globules rouges du Cheval, du Chien, du Lapin et du Mouton contiendraient des peptidases énergiques ; le sérum normal n'en renferme pas. Tous les pressis d'organes dissocient les polypeptides, sauf le cerveau.

Parmi les *amidases* dissociant les amides-acides-amines : asparagine, ou les amino-purines : guanine et adénine, on a signalé la présence de l'*asparaginase* chez le Porc, le Rat et certains Herbivores. Le foie, le rein et le testicule des Oiseaux en renfermeraient également.

L'*histozyme* de Schmiedeberg, ferment dissociant l'acide hippurique, se rencontrerait dans le foie et le rein chez le Porc, le Chien et le Rat.

La dissociation de l'histidine n'a été signalée que chez les Oiseaux, par Edlbacker.

La xanthine serait dissociée dans le foie, les reins et les organes de la Grenouille (Przylecki).

L'autolyse libérerait un ferment dissociant la créatine (Gottlieb et Stangassinger).

L'autolyse a montré que les organes contenaient des ferments protéolytiques liés au substratum cellulaire : le cerveau contiendrait une protéase, mais ni uréase ni guanase.

L'ovaire, l'hypophyse, le thymus renfermeraient des protéases.

Sexsmith et Petersen ont particulièrement étudié la *protéase* de la peau ; son optimum d'action serait nettement acide. Klopstock, étudiant la richesse comparative, en ferment protéolytique, de la peau des diverses régions du corps a observé que la peau de la partie supérieure de la cuisse et des organes génitaux était plus riche que celle de la poitrine et du dos. Le même auteur a signalé la présence, dans la peau, d'un ferment décomposant les nucléines.

Le placenta contiendrait, outre une *protéase* organique, une *tryptase* et une *éreptase* énergiques.

La *protéase* de la glande mammaire dissocierait exclusivement les albuminoïdes provenant de la glande même.

L'œuf de Poule renfermerait également une *protéase*.

Parmi les sécrétions, le lait contiendrait une *protéase* d'origine leucocytaire, Morgan, Stewart et Hopkins y ont également décelé une *adénase* et une *xanthodéhydrase*. L'urine normale renfermerait une *peptidase*. Le liquide amniotique contiendrait de la pepsine.

Ferments des lipides.

Les *lipases* sont extrêmement répandues dans l'économie animale. La mieux connue est certainement la *lipase pancréatique* que l'on trouve dans le pancréas de tous les Vertébrés et dans l'hépatopancréas des Poissons.

L'étude de l'influence du pancréas sur la digestion et la résorption des graisses, magistralement abordée par Claude Bernard et Dastre, a été récemment reprise par Magnus-Lévy et L.-E. Meyer. Si on transplante la glande sous la paroi

abdominale ou si on s'oppose à ce que la sécrétion parvienne dans l'intestin, la résorption des graisses ne s'en fait pas moins normalement, soit que le ferment résorbé par le sang parvienne dans l'intestin, soit que la lipase intestinale supplée à son absence. Cependant, si l'ablation totale de la glande ne supprime pas l'absorption des graisses (L. Binet), elle entraîne généralement des troubles de la résorption caractérisés par la formation de dépôts de graisse, fait qui conduit Magnus-Lévy et Meyer à admettre une relation spéciale entre le pancréas et la résorption des graisses, peut-être par l'intermédiaire d'une sécrétion interne.

II. Roger et L. Binet ont particulièrement insisté sur l'action activante de la bile sur les lipases pancréatique et intestinale. Il résulte de nombreuses recherches que la teneur en lipase de l'intestin humain varierait peu autour d'une valeur fixe.

Une question longtemps controversée fut celle de l'existence d'une lipase gastrique propre. Toutefois sa présence dans l'estomac isolé, suivant la technique de Pawlow, permet de conclure à sa présence dans l'estomac des animaux. Le fait que l'on a trouvé ce ferment dans l'estomac du nourrisson, où il n'y a pour ainsi dire jamais reflux du suc pancréatique, laisse supposer qu'il existe également chez l'homme.

Il semble bien que la *lipase* se rencontre dans tous les tissus, en particulier le tissu adipeux sous-cutané ; d'autres tissus riches en graisses en seraient dépourvus, ainsi la glande mammaire.

Parmi les organes, le cerveau, (substance blanche), les nerfs, l'ovaire, l'hypophyse, le thymus renfermeraient *lipase* et *lécithase*.

Le poumon de l'Homme, des Mammifères et des Oiseaux est très riche en *lipase*.

H. Roger et L. Binet ont montré que cet organe était capable de dissocier (fonction lipodiérétique) les graisses accumulées dans ses vaisseaux capillaires (fonction lipopectique).

L'examen histologique de fragments pulmonaires immédiatement après injection d'huile montre la présence de globules gras dans les artérioles et les capillaires pulmonaires. Ulté-

rieurement, on observe en même temps qu'une hypertrophie des cellules de l'endothélium vasculaire, une modification profonde des globules de graisse : aspect festonné des contours et apparition de vacuoles dans leur partie centrale (H. Roger, L. Binet et J. Verne).

Etudiant le pouvoir lipodiérétique comparatif de divers organes, H. Roger et L. Binet ont pu les classer dans l'ordre suivant :

foie > poumon > ganglions mésentériques > pancréas > rate > muscles > cerveau.

Nattan-Larrier et Ficaï ont étudié la lipase du placenta ; ces auteurs ont montré qu'il n'y avait aucune relation entre la teneur en lipase du placenta et du sang maternel. Le ferment augmente au cours du développement fœtal.

Parmi les différents laits, seul celui de femme renferme un ferment lipasique ; chez la vache, il n'apparaîtrait qu'en cas de lactation prolongée.

Ferments oxydants.

Très rarement, les *phénolases* ont pu être extraites des cellules.

Les réactions des *peroxydases* ont été observées presque partout par examen microchimique. Keilin a fait récemment remarquer que le cytochrome, analogue à l'hémoglobine, très largement répandu dans les tissus, donnait les réactions des peroxydases.

Scheunert a observé une réaction positive à la teinture de gaïac dans tout le tractus intestinal.

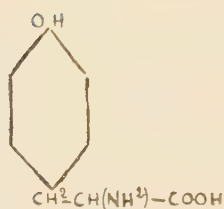
Batelli et Stern ont désigné sous le nom de phényldiaminoxydon un système fermentatif, association de peroxyde et de fer, isolé des leucocytes. La peroxydase du lait serait d'origine leucocytaire.

Ces *oxydases* joueraient un rôle important dans la formation des pigments animaux à partir des diphénols.

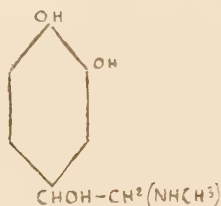
La peau normale a une action oxydante sur la pyrocatéchine, ainsi que le sérum du sang, la glande mammaire, le placenta, le lait et l'albumine d'œuf.

La *tyrosinase* a été décelée dans la peau des Mammifères, dans la peau et les œufs d'Amphibiens et chez les poissons.

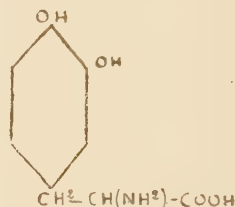
Ces tyrosinases seraient les agents actifs de la mélanogénèse ; par oxydation fermentative, le chromogène : amino-acide phénolique, serait transformé en mélanine. Bien que l'on ignore à peu près totalement la nature de ce chromogène, on a admis trois générateurs de mélanine : tyrosine, adrénaline et dioxyphénylalanine, très facilement oxydables.



Tyrosine



Adrénaline



Dopa
(Végétaux, Hanneton)

J. Verne a montré que, chez les Crustacés décapodes, la pigmentation résulte de l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, mais on ne connaît rien du mécanisme de son oxydation chez l'homme. D'après les travaux de Loeper, il semble que le soufre joue un rôle important dans la formation des mélanines.

La *catalase*, ferment décomposant le peroxyde d'hydrogène, est extrêmement répandue dans le monde animal. Lasser a pu ranger les Vertébrés d'après leur richesse en catalase dans l'ordre suivant : Cobaye > Lapin > Chien > Oiseau > animaux à sang-froid.

Le pouvoir catalytique du sang s'évalue d'après la richesse en ferment des globules :

Index de catalase = $\frac{\text{nombre de catalase des globules}}{\text{nombre de millions}}$ Ce nombre varie normalement entre 5,4 et 6,8. Toutefois, il n'a rien d'absolu, car Bach a trouvé de très grandes variations chez l'homme.

Le lait contient de la catalase qui proviendrait des leucocytes.

Parmi les organes, le foie est le plus riche en catalase. Batelli et Stern ont rangé les tissus dans l'ordre suivant :

foie > cerveau > muscle.

Ferments réducteurs.

Tous les tissus renferment des ferments réducteurs aisément décelés par la méthode d'Ehrlich : le bleu d'alizarine est facilement réduit à l'état de composé incolore et redevient bleu par oxydation. De même, le bleu de méthylène donne par réduction un leucodérivé incolore. H. Roger, étudiant le pouvoir réducteur des tissus, par cette méthode, a observé qu'ils se rangeaient dans l'ordre suivant :

Chez le Chien : cerveau > rein > foie.

Chez le Cobaye et le Lapin : foie > rein > cerveau.

Une question intéressante est celle de la formation des ferments dans les organes.

Tandis que certains ferments apparaissent librement sécrétés dans les sucs digestifs et le sang, les autres ne se séparent des éléments cellulaires qu'après leur mort, par autolyse ou par broyage mécanique.

La plupart de ces endoferments, d'après les auteurs modernes, seraient sécrétés sous forme de proferments ou *zymogènes*. Il s'agirait de formes inactives par adsorption avec des protéïques ; sous l'influence de divers facteurs : modifications de la réaction du milieu, hydratation ou électrolytes, détruisant ces adsorptions, il y aurait passage des ferments de la forme passive à la forme active. On ignore, à vrai dire, à peu près tout de la nature des complexes d'adsorption colloïdo-chimiques.

En ce qui concerne les exoferments, on a voulu rechercher les modifications histologiques accompagnant la sécrétion. D'une façon générale on admet qu'au repos les cellules sécrétrices, contenant peu de protoplasme, sont remplies de substance homogène ou granuleuse, matériel de formation des ferments. Sous l'influence d'excitants appropriés, la cellule sécrète, élimine le ferment, en devenant de plus en plus petite. Les granules que l'on considérait autrefois comme des formes

de zymogènes, seraient des agrégats colloïdaux d'adsorption.

La sécrétion des ferments est sous la dépendance de la régulation nerveuse du mécanisme des glandes et aussi des excitations chimiques venant des aliments, comme l'ont montré les belles recherches de Pawlow.

Un fait intéressant est celui de la formation adaptative de ferments que nous avons déjà signalée (p.26).

Expérimentant sur des Bactéries, Jacoby a étudié les conditions de formation de l'uréase ; le milieu de culture le plus simple, indispensable, comprenait outre des éléments minéraux, de la glycérine, du lactate d'ammonium, de la leucine et de l'asparaginate de sodium. Seule, la leucine naturelle est efficace, car si on la remplace par son isomère synthétique, le ferment n'apparaît pas. Le pH optimal est 7,2.

Le bouillon, le sérum, le glucose auraient une action active à des quantités si faibles qu'ils ne peuvent plus agir comme nourriture, mais seulement par leur structure chimique particulière ; ceci ressort encore du fait que le mannose, cependant très voisin du glucose, n'a aucun effet sur la production du ferment.

Toutefois, cette adaptation n'a rien d'absolu, car chez l'*Aspergillus niger*, p. ex. on a pu observer que la production d'amylase ou de sucrase était absolument indépendante de la composition du milieu de culture.

Que deviennent ces exoferments, une fois sécrétés ? On a montré que les ferments du tube digestif se retrouvent dans tout son parcours et passent dans les fèces. La pepsine, cependant, serait détruite dans le gros intestin (Abderhalden).

Il y aurait aussi résorption des ferments au niveau de l'intestin grêle.

Les ferments du sang et de la lymphe proviendraient, le plus souvent, des éléments figurés : leucocytes et cellules d'organes ; de même les ferments de défense d'Abderhalden. On ne sait cependant pas comment se fait le passage.

On a observé que, par occlusion spontanée ou ligature des canaux pancréatiques ou augmentation de la sécrétion par injection de pilocarpine, les ferments pancréatiques, apparaissaient dans le sang et l'urine. Les ferments du sang ne sont pas toujours éliminés par l'urine. C'est ainsi que les

ferments étrangers : émulsine, uréase, invertine de levure, injectés dans le sang, sont en partie détruits sur place.

FERMENTS DE L'EMBRYON.

A quel stade du développement apparaissent les agents de la digestion, de la nutrition de l'être vivant ? Apparaissent-ils seulement lorsque leur présence est rendue nécessaire par la nature de l'alimentation ? Existent-ils chez le nouveau-né chez lequel aucun aliment n'a encore été introduit ? Dans ce cas, à quelle période de formation de l'embryon peut-on déceler leur présence ?

Bien que les renseignements fournis sur ce sujet soient assez peu précis, ils permettent cependant de conclure à la présence de presque tous les ferments à la naissance et à la formation très précoce de la plupart d'entre eux.

Examinons dans quel ordre se fait cette apparition ?

De nombreuses expériences d'Abderhalden ont permis de mettre en évidence des peptidases chez un embryon de porc qui n'atteignait pas plus de 33 mm. de longueur, de pepsine chez un embryon de rat de 45 mm.

Chez l'embryon humain, les ferments apparaîtraient dans l'ordre suivant : entérokinase au 3^e mois, saccharase et pepsine au début, maltase à la fin du 4^e mois, trypsine, érepsine au 5^e mois (Langendorff), amylase au 6^e mois, lipase au 8^e mois ; la laccase apparaît la dernière, car elle n'existe pas encore chez le prématuré de 8 mois.

Kölliker a d'ailleurs montré qu'au point de vue histologique, les glandes gastriques et intestinales étaient complètement formées au 5^e mois. Toutefois, le suc gastrique n'ayant pas de réaction acide avant la naissance, la pepsine serait inactive à ce stade.

La présence d'amylase dans la salive du nouveau-né a été confirmée par Schiffer et Korowin, elle augmenterait du 1^{er} au 12^e mois. On l'a décelée également dans d'autres organes : muscles, poumons, où elle se formerait.

Remarquons qu'il y a de grandes variations dans les différentes espèces.

Tandis que chez les Mammifères (Cobaye, Rat, Lapin) presque tous les ferments ont pu être décelés avant la naissance (excepté chez la Truie), chez les Oiseaux (Poulet), la lactase manque, la pepsine n'apparaît que le 2^e jour, et les ferments pancréatiques seulement à partir du 7^e jour.

Chez les Carnivores, seule la pepsine a été décelée à la naissance, et même Hammarsten, puis Sewall ont conclu à son absence chez des chiens tués à 4 et 5 jours.

Ainsi, dans la plupart des espèces animales, les ferments sont sécrétés chez l'embryon bien qu'ils n'aient alors aucun rôle à jouer dans la nutrition.

Aucune recherche n'a été effectuée sur le pouvoir d'attaque des ferments de l'embryon ; il serait cependant intéressant d'étudier ce pouvoir aux différents stades du développement de l'être comparativement à celui des ferments de l'adulte.

d) CINÉTIQUE DES ACTIONS FERMENTATIVES

1° Vitesse des réactions

La détermination de la *vitesse* des réactions fermentatives constitue véritablement le but de toutes les investigations effectuées sur cette question. Elle constitue, pour ainsi dire, la caractéristique de chaque ferment, le critérium qui permet la comparaison facile des différentes préparations entre elles, le plus souvent à l'aide d'un simple graphique.

C'est à Wilhelmy (1850) que revient le mérite d'avoir établi la première formule permettant de représenter cette vitesse. Cet auteur a posé le principe que la vitesse d'une réaction chimique, en général, est, à chaque instant, proportionnelle à la grandeur de la substance non encore transformée. Sur ces données, Guldberg et Waage énoncèrent la loi d'action de masses, sur laquelle repose toute la dynamique chimique. Si une molécule A se dissocie en 2 autres, B₁ et B₂, l'équilibre est obtenu quand on a :

$$\frac{[A]}{[B_1] \cdot [B_2]} = K$$

K représente la *constante d'affinité* ou *d'équilibre* de la réaction ; sa valeur réciproque :

$$K_A = \frac{[B_1] \cdot [B_2]}{[A]}$$

est la *constante de dissociation* du corps A.

La vitesse de la réaction V est exprimée par la différence entre les vitesses de transformation dans un sens et dans l'autre (les réactions étant généralement réversibles), vitesses proportionnelles à la concentration de chaque participant à la réaction :

$$\begin{aligned} v_1 &= k_1 [A_1] \cdot [A_2] \cdot \dots \\ v_2 &= k_2 [B_1] \cdot [B_2] \cdot \dots \end{aligned}$$

où k₁ et k₂ représentent des *constantes de vitesse*.

$$D'o\grave{u} \quad V = v_1 - v_2 = k_1 [A_1] \cdot [A_2] \dots - k_2 [B_1] \cdot [B_2] \dots$$

La réaction type la plus simple est représentée par la *réaction monomoléculaire irréversible*, dans laquelle il n'y a qu'une seule espèce de molécules subissant la transformation ; le dédoublement du saccharose en glucose et lévulose, par exemple, peut être considéré comme une réaction monomoléculaire, s'il se produit en solution aqueuse très diluée.

La vitesse d'une telle réaction, exprimée algébriquement par l'expression $\frac{dx}{dt}$ est proportionnelle à la concentration de la substance non encore transformée, $a - x$, a étant la concentration moléculaire initiale de la molécule réagissante, et x la quantité de substance transformée au temps t .

$$\text{Donc :} \quad v = \frac{dx}{dt} = K (a - x).$$

et, en intégrant, on obtient la formule générale

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}$$

Remarquons que, dans la pratique, on utilise le plus souvent les logarithmes décimaux ($\log_{10}$) au lieu des logarithmes népériens ($\ln$), en négligeant le facteur de proportionnalité

$$\frac{1}{0,4343}.$$

Si 2, 3 ou plusieurs substances réagissent simultanément, les réactions sont dites *bimoléculaires*, *trimoléculaires* ou *polymoléculaires*.

Citons comme exemple de réaction *bimoléculaire irréversible* la saponification des éthers-sels par une base minérale.

La vitesse v au temps t est égale au produit des concentrations a de l'éther et b de la base, multiplié par la constante k

$$v = \frac{dx}{dt} = k (a - x) (b - x).$$

x étant la concentration moléculaire de l'alcool formé au temps t .

En intégrant :

$$kt = \frac{1}{a - b} \ln \frac{b(a - x)}{a(b - x)}.$$

Pour une réaction d'ordre n , la vitesse initiale est donnée par l'équation :

$$v = \frac{dx}{dt} = k.C^n.$$

Dans le cas d'une réaction *monomoléculaire réversible*, par exemple, dans le cas du passage de la forme énolique à la forme cétonique :



la vitesse de réaction à l'instant t est :

$$v = \frac{dx}{dt} = k_1(a - x) - k_2x.$$

et, en intégrant :

$$k_1 + k_2 = \frac{1}{t} \ln \frac{k_1 a}{k_1 a - x(k_1 + k_2)}$$

Si la réaction est bimoléculaire réversible, dans le cas de l'éthérification, par exemple, les vitesses v_1 de l'éthérification et v_2 de la saponification à l'instant t sont exprimées par les formules :

$$v_1 = k_1.C_1.C_2 \quad ; \quad v_2 = k_2.C_3.C_4.$$

et la vitesse résultante V est égale à la différence :

$$V = v_1 - v_2 = k_1.C_1.C_2 - k_2.C_3.C_4.$$

Le système atteindra son équilibre quand la vitesse de réaction V_e sera nulle :

$$V_e = v_{1e} - v_{2e} = 0.$$

Les réactions fermentatives sont des réactions *progressives, limitées* et généralement *réversibles*.

Grâce à ces données générales, les expérimentateurs disposent de méthodes pratiques pour la détermination de la vitesse des réactions fermentatives.

1° S'il s'agit de réactions monomoléculaires simples on peut calculer facilement la constante de vitesse k en fait

sant un certain nombre de mesures de x à des intervalles variés.

2° Une méthode nouvelle consiste à déterminer, par différentes méthodes faites au cours de la réaction, les « *valeurs de temps* », c'est-à-dire le temps pendant lequel la quantité de ferment présente transforme une fraction déterminée du substrat, par exemple 50 %. Cette méthode est particulièrement intéressante pour l'étude de la spécificité des ferments vis-à-vis des substrats attaqués.

3° Enfin, on peut utiliser des courbes empiriques en évaluant le rapport entre les quantités de ferment et de substrat transformé dans des conditions déterminées et pendant une durée déterminée. C'est un moyen commode pour comparer l'action de diverses préparations.

S'il y a proportionnalité entre les quantités transformées et la quantité de ferment, on obtient des courbes linéaires.

2^o Les ferments, catalyseurs biochimiques.

Les plus anciennes observations faites sur le mode d'action des ferments, étaient les suivantes :

1^o Ces corps agissent généralement en quantité extrêmement petite, pour déclancher ou accélérer considérablement des réactions qui, sans leur intervention, ne se produiraient pas, ou ne se feraient qu'à des vitesses très faibles.

2^o Ces corps peuvent favoriser la transformation de masses énormes des substrats sur lesquels ils agissent.

3^o Ils se retrouvent inaltérés à la fin des réactions et peuvent, pour ainsi dire, fonctionner indéfiniment, si des facteurs nocifs ne les amoindrissent pas.

De telles propriétés devaient amener les auteurs à rapprocher ces substances d'autres agents énergétiques, à savoir les *catalyseurs*, découverts par Berzélius en 1836, et définis de la façon suivante :

Un catalyseur est un corps « qui, introduit en faible proportion dans un système chimique, en provoque ou en accélère considérablement l'évolution, sans paraître prendre part à la réaction ».

Un tel corps ne produit pas la réaction, son seul effet est de modifier considérablement sa vitesse.

De très nombreuses substances sont susceptibles de jouer ce rôle, soit, grâce à leur état physique (noir animal), soit, par leur activité chimique (acides minéraux, bases, métaux divisés, platine colloïdal).

Les ferments constitueraient les *catalyseurs biochimiques*.

Remarquons d'ailleurs que la catalyse peut être une action négative ; ce serait le cas, d'après Moureu et Dufraisse, pour les phénols, dont l'action « antioxygène » s'oppose fortement à l'autoxydation des substances organiques.

D'après Clément et Désormes, il y aurait combinaison intermédiaire entre catalyseur et substrat, puis décomposition rapide.

De même, l'hypothèse la plus généralement admise pour les ferments (H. Colin et A. Chaudun) est qu'il se formerait

également une combinaison intermédiaire indéterminée, chimique ou colloïdale, entre ferment et substrat.

De nombreux facteurs influencent la vitesse des réactions fermentatives. D'après l'origine et le mode d'influence de ces facteurs, nous les avons rangés en deux classes :

A — les *facteurs endogènes*, faisant partie intégrale de la réaction.

B — Les *facteurs exogènes*.

On conçoit que dans la détermination de la vitesse d'une réaction fermentative, il importe de tenir soigneusement compte de l'intervention possible de ces facteurs, et d'éliminer leur influence en les maintenant constants.

D'autre part il ne faut pas oublier que les différentes méthodes : gravimétrique, titrimétrique, polarimétrique, stalagmométrique, calorimétrique, utilisées pour mesurer les quantités transformées comportent elles-mêmes des erreurs qui faussent les résultats obtenus ; il est donc utile de contrôler ces méthodes.

3° *Facteurs influençant les réactions fermentatives.*

A) FACTEURS ENDOGÈNES DE LA RÉACTION.

Trois éléments interviennent :

- 1° La concentration du ferment ;
- 2° La concentration du substrat ;
- 3° Les produits de la réaction.

1° *Influence de la concentration du ferment.*

L'une des caractéristiques essentielles de la vitesse d'action d'un ferment est sa dépendance vis-à-vis de la quantité de ferment mise en jeu. Pour mettre ce fait en évidence, Bredig a donné la comparaison imagée suivante : la vitesse d'une machine, mise en mouvement par le déplacement d'un frein, est indépendante du levier qui actionne le frein, mais dépend de la quantité d'huile de graissage qui supprime les frottements des pièces de la machine.

Dans le cas le plus simple, il y a proportionnalité entre la quantité de ferment et la vitesse de réaction. Cette relation a pu être vérifiée dans un certain nombre d'expériences sur l'inversion de solutions diluées de sucre de canne.

On a proposé également, pour la vitesse, la relation :

$$V = c.K^m$$

K , désignant la concentration du catalyseur, c , un facteur de proportionnalité, m , une constante caractéristique du catalyseur.

Pour de nombreux ferments, on a constaté que si la concentration de l'enzyme croît, la vitesse de réaction croît jusqu'à un certain maximum, puis reste constante. C'est notamment ce que nous avons observé dans le cas de l'amylase et de la trypsine.

Sous le nom de catalyse *positive* ou *négative*, on désigne les cas où la constante de réaction augmente ou diminue

proportionnellement à la concentration d'un produit de la réaction.

Si k_1 est le coefficient de vitesse de la réaction non catalysée, k_2 , le coefficient de l'autocatalyse, la vitesse est :

$$V = \frac{dx}{dt} = (k_1 \pm k_2 x) (a - x).$$

Le signe $+$ correspond à l'autocatalyse positive, le signe $-$ à l'autocatalyse négative.

En intégrant, on a pour l'autocatalyse positive :

$$t = \frac{1}{k_1 \mp k_2 a} \ln \frac{a (k_1 \mp k_2 x)}{k_1 (a - x)}$$

et pour l'autocatalyse négative :

$$t = \frac{1}{k_1 \mp k_2 a} \ln \frac{a (k_1 \mp k_2 x)}{k_1 (a - x)}$$

A vrai dire, il ne s'agit, pour ces phénomènes d'autocatalyse, que d'hypothèses ne reposant pas sur des faits expérimentaux solides.

Pour l'action de la pepsine, Schütz a établi la règle suivante, qui porte son nom :

Différentes quantités de pepsine digèrent dans des temps égaux des quantités d'albumine qui sont entre elles comme les racines carrées des quantités de ferment.

Cette loi s'exprime par la relation :

$$x = p \sqrt{F}.$$

x , transformation au bout d'un temps déterminé,

p , facteur de proportionnalité,

F , quantité de ferment.

Cette règle ne s'applique, du reste, qu'au premier stade du processus, quand la transformation ne dépasse pas 30 à 40 %.

D'après Arrhénius (expérience sur la saponification de l'éther acétique), il ressort de la règle de Schütz, que la vitesse de réaction est proportionnelle non seulement à la

quantité qui reste à transformer, mais aussi inversement proportionnelle à la quantité déjà transformée :

$$V = \frac{dx}{dt} = \frac{k([A] - x)}{x}$$

et en intégrant :

$$k = \frac{[A]}{t} \ln \frac{[A]}{[A] - x} = \frac{x}{t}$$

On a proposé également pour certaines protéolyses fermentatives l'équation :

$$x = q \sqrt{t}.$$

c'est-à-dire que la quantité de ferment restant constante, la transformation, entre certaines limites, est proportionnelle à la racine carrée de la durée de la réaction, q étant un facteur de proportionnalité.

2° Influence de la concentration du substrat.

Lorsqu'on fait varier la concentration du substrat, la quantité de ferment actif restant la même, on observe généralement que la vitesse croît jusqu'à un certain maximum, à partir duquel elle décroît.

H. Colin et A. Chaudun, étudiant l'inversion du saccharose par la sucrase, ont insisté sur l'intérêt particulier que présente le rapport $\frac{\text{saccharose}}{\text{sucrase}}$.

Ces auteurs admettent l'hypothèse d'une combinaison intermédiaire entre sucrase et saccharose, la vitesse de formation de cette combinaison étant infiniment grande par rapport à sa décomposition.

Soient : a gr. la concentration initiale du saccharose,
 n cc. la quantité totale de ferment,
 u cc. la quantité de ferment que peuvent fixer μ gr.

1° $n > \mu$.

μ s'unissant à la totalité du sucre disponible, $n - \mu$ cc

de sucrase restent inutilisés. La transformation qui se fait suivant la loi d'action de masse est complète, et si on augmente la teneur en ferment, on n'observe aucune modification de la vitesse, indépendante de la concentration en ferment.

Si a croît, une nouvelle quantité de sucrase se combine au sucre, et la vitesse augmente proportionnellement à a .

2° $n < \mu$.

n cc. de sucrase s'unissent à a gr. de saccharose; il reste un excès de sucre non combiné. La combinaison saccharose-sucrasede se reforme au fur et à mesure de sa destruction. Tant que l'excès de sucre n'a pas disparu, la vitesse reste constante.

S'il n'y a plus de sucre en excès, la vitesse d'hydrolyse diminue et devient proportionnelle au poids du sucre non encore transformé.

Si, dans ces conditions on fait croître a , la vitesse ne se modifie pas, la quantité de ferment restant inchangée.

Si n augmente seul, la vitesse varie proportionnellement à n .

3° *Influence des produits de la réaction.*

Nous l'étudierons en même temps que l'action des substances activantes et paralysantes.

B) FACTEURS EXOGÈNES DE LA RÉACTION.

Deux groupes de facteurs exercent une influence sur les réactions fermentatives.

a) Les facteurs physiques : température, concentration des ions H, lumière...

b) Les facteurs chimiques : substances paralysantes ou activatrices.

a) *Facteurs physiques.*

Température. — On sait que les ferments, eux-mêmes, sont, d'une manière générale, très sensibles à l'action de la température et plus particulièrement aux températures élevées qui amènent leur destruction. En somme, il existe pour chaque ferment deux températures critiques : une température *optimale*, pour laquelle l'action du ferment est maximale, et une température *mortelle*, assez peu élevée, variable de 45 à 80°.

On a admis que la destruction des ferments par la chaleur se faisait également suivant une réaction monomoléculaire ; la vitesse de ce phénomène étant exprimée par la *constante d'inactivation* k_c :

$$k_c = \frac{1}{t} \ln \frac{F}{F - y}$$

F , quantité initiale de ferment ;

y , quantité détruite au bout du temps t .

La sensibilité à la température des différents ferments, très variable, dépend essentiellement de la concentration des ions H, comme l'a montré Euler. Elle dépend également de la nature et de la quantité des substances étrangères présentes, augmente généralement avec le degré de pureté. Les produits de la dissociation et les activateurs exercent une action protectrice.

Remarquons que les ferments sont généralement très résistants aux basses températures, surtout à l'état sec.

Les modifications de la température influencent considérablement la vitesse des réactions. Van't Hoff exprime cette influence sur la constante de vitesse par la relation générale suivante :

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{q}{RT^2}$$

q , tonalité calorique de la réaction à la température absolue T ,

R , la constante des gaz.

Si, pour un certain intervalle de température, la tonicité calorique est constante, par intégration de l'équation précédente on obtient pour le rapport des constantes d'équilibre K_1 et K_2 , correspondant aux températures T_1 et T_2 :

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = \frac{1}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

formule qui indique la modification de la position d'équilibre avec la température.

Dans les réactions endothermes, K augmente en même temps que la température.

Dans les réactions exothermes, K diminue si la température augmente.

Si la tonicité calorique est très faible, $K_1 = K_2$, l'équilibre est indépendant de la température.

Pour les hydrolyses de protéines, de glucides et de lipides, la tonicité calorique est très faible.

Concentration en ions H. — Très anciennement connue est l'influence exercée par l'acidité ou l'alcalinité du milieu sur les processus fermentatifs. Toutefois cette notion était très imprécise, et bien que la plupart des expérimentateurs en aient tenu compte dans leurs investigations, aucune mesure exacte n'avait été effectuée. C'est à Michaelis, Sørensen et leurs collaborateurs que revient le mérite d'avoir étudié cette influence d'une façon très minutieuse.

Les résultats des recherches de ces auteurs devaient révolutionner toute l'expérimentation sur cette question en introduisant la notion de la détermination quantitative indispensable du pH dans toute recherche sur l'action fermentative.

Les expériences de Michaelis et Rona sur l'adsorption de l'invertase de levure par l'argile et le kaolin avaient permis à ces auteurs de conclure que ce ferment devait être considéré comme une substance amphotère à caractère acide prédominant.

Par une série d'expériences, dans lesquelles ils ont fait

varier le pH par addition de mélanges tampons convenablement choisis, ces auteurs ont pu conclure que l'invertine était un électrolyte amphotère, dont la constante de dissociation acide est 2×10^{-7} et la constante de dissociation basique environ 10^{-12} , et dont l'optimum d'action correspond à son point isoélectrique ; cet optimum est, en réalité, une large zone isoélectrique. Ces résultats ont été confirmés par Sørensen et Koefoed.

Michaelis et Davidsohn, étudiant dans les mêmes conditions la trypsine, ont conclu que ce ferment, électrolyte amphotère, se présentait, suivant le pH de la solution, sous forme d'anions, de cations ou de molécules non dissociées. Seuls les anions ont une action protéolytique. La constante de dissociation acide est 5×10^{-7} et l'optimum correspond au pH d'environ 8.

Sørensen a ainsi déterminé les caractéristiques de la plupart des ferments en fonction du pH du milieu. Pour la catalase par exemple, dont les anions sont seuls actifs, la constante de dissociation acide $K_a = 6 \times 10^{-9}$, la constante de dissociation basique $K_b = 3 \times 10^{-10}$. Le point optimal très limité correspond au pH = 7.

Notons que le pH optimal est à peu près fixe pour les ferments des glucides et des lipides. Pour les protéases, par contre, il varie souvent avec la nature du substrat. (V. Etude sur la trypsine, 2^e partie.)

Sørensen a insisté sur le fait que, dès que l'on s'éloigne du point ou de la zone optimale, il y a destruction assez rapide du ferment, cette destruction dépendant très étroitement du pH, de la température et de la durée de l'expérience. La destruction est généralement moins rapide aux basses températures. Pour l'invertase, par exemple, Euler a observé qu'à 50°, pour une concentration d'ions $H = 10^{-3}$, l'activité du ferment diminue ; si la concentration est de 10^{-2} , l'invertase est rendue rapidement inactive. Une concentration de 10^{-6} à 50° produit une inactivation instantanée du ferment.

Enfin, Sørensen a insisté sur la nécessité de maintenir le pH constant au cours de l'étude des réactions fermentatives, pour éliminer l'influence des variations de ce facteur sur les

ferments, ce que l'on obtient par l'addition de mélanges tampons. (Voir l'étude de la trypsine, 2^e partie.)

Nous n'étudierons pas l'action des autres agents physiques, lumière, pression, etc., l'étude de leur influence présentant un intérêt moindre. Mentionnons seulement que les ferments sont généralement très résistants à la lumière. L'inactivation dans la partie visible du spectre serait liée à la présence d'oxygène et se ferait suivant la loi monomoléculaire (Lüers et Lorinser).

Substances activantes et paralysantes. — Nombreux sont les agents chimiques qui influencent la vitesse d'action des ferments, soit pour l'accélérer, soit pour la retarder.

En se basant sur l'hypothèse d'une combinaison entre ferment et substrat, on peut admettre plusieurs hypothèses : ou bien la substance exerce une influence sur la concentration de cette combinaison intermédiaire : c'est le cas pour les produits de dissociation qui se lient à la partie libre du ferment (lévulose pour l'invertase) ; ou bien la substance exerce son influence sur la vitesse de décomposition de cette combinaison et par suite de la réaction (glycérine pour l'invertase) ; ou bien le ferment est directement attaqué et détruit (métaux lourds), ou, au contraire, protégé contre la destruction par des substances protectrices (Willstätter) formant avec lui des combinaisons colloïdales d'adsorption (acides aminés, acide cyanhydrique, sels neutres).

Certains corps agissent électivement sur un ferment déterminé, ce sont les activateurs spécifiques ou kinases (Voir 2^e partie), ou les paralysateurs spécifiques (produits de dissociation, expérience de Tamman sur l'émulsine : par addition artificielle de ces produits, l'action est paralysée, par enlèvement, le ferment se montre plus actif — voir également étude sur la trypsine, 2^e partie).

Notons que les ferments peuvent se détruire réciproquement : la pepsine, par exemple, a une action nocive sur la trypsine, sur l'amylase ; la trypsine détruit la pepsine et la zymase.

e). *Les ferments et la pathologie.*

Nous ne traiterons pas en détail cette question qui sort un peu du cadre de ce travail biologique sur les ferments.

Mais nous voudrions particulièrement insister sur l'importance des ferments au point de vue de leurs rapports avec la pathologie générale.

De nombreux auteurs ont préparé une série d'*antiferments*, particulièrement contre les protéases, après traitement préalable des animaux. Mais Abderhalden insiste sur le fait que l'on n'a injecté que des ferments impurs contenant de l'albumine qui fait diminuer la réaction fermentative sans que le sérum y prenne part ; on ne peut donc à proprement parler d'antiferments.

Un fait intéressant, cependant, est la spécificité de ces anticorps, suivant la nature du ferment : l'antiprotéase, par exemple, n'a aucune action sur la lipase ; ou suivant son origine : les anticorps des zooferments n'agissent pas sur les phytoferments, et réciproquement ; la trypsine du pancréas n'agit pas sur la trypsine bactérienne.

D'autre part, par chauffage à 60° de certains ferments : pepsine, lab, amylase, émulsine, on a obtenu des substances paralysantes ou zymoïdes ; ce seraient des produits de transformation des ferments, paralysants pour de nouvelles quantités de ferment ajoutées.

Certains auteurs considèrent les ferments comme des antigènes, capables de former une liaison spécifique avec le substrat. C'est le seul point qui les rapprocherait des toxines, et, comme le dit Oppenheimer, il est bien difficile de comparer la liaison de la sucrase avec le saccharose à la liaison du venin de cobra avec la cellule nerveuse. Le fait le plus sûr est que l'on ne peut admettre la formation véritable d'antiferments, condition essentielle pour ranger les ferments parmi les antigènes. On ne sait d'ailleurs pas quelle partie du ferment jouerait le rôle d'antigène : est-ce la partie active ou le support colloïdal ? De toutes façons, il ne s'agit là que de possibilités, mais non de certitudes.

La toxicité des ferments serait due aux substances associées : la trypsine, la papaïne, en particulier, sont très toxiques. Plus les ferments sont purifiés, moins ils sont toxiques ; la toxine proviendrait des tissus dissociés. D'autre part, le ferment injecté peut être nocif par digestion de l'albumine tissulaire.

Au point de vue pathologique on a surtout étudié les ferments des tumeurs ; on y a décelé une protéase dont l'optimum correspondrait au $\text{pH} = 7$, une nucléase, une lipase une amylase, des oxydases dans les tumeurs pigmentaires. Warburg a insisté sur la forte glycoluse des cellules cancéreuses.

L'urine albumineuse contiendrait une tryptase.

f) *Les ferments, agents thérapeutiques*

Nous mentionnons seulement ce paragraphe, cette question n'ayant pas encore été résolue au point de vue médical. Les différents essais faits avec les préparations de ferments dans le but d'améliorer les sécrétions digestives n'ont donné que des résultats très médiocres, sans doute à cause des nombreuses impuretés qui diminuent considérablement l'activité de ces préparations.

Pour le premier groupe, nous avons choisi l'amylase saliva-

Pour le deuxième, une protéase : la trypsine pancréatique.
Pour le troisième, la lipase intestinale.

CHÂPITRE PREMIER

ÉTUDE DE L'AMYLASE

Très important au point de vue biologique général, le problème de la désintégration des polysaccharides complexes n'est pas moins intéressant au point de vue chimique : c'est, en effet, grâce aux recherches modernes sur l'hydrolyse de l'amidon que la constitution de ce corps a pu être en grande partie élucidée et que l'on a pu donner des schémas satisfaisants pour représenter sa structure fondamentale. Nous exposerons tout d'abord les principaux résultats obtenus par l'étude de la dissociation fermentative de l'amidon et les déductions tirées de cette étude relativement à sa constitution, puis les recherches que nous avons entreprises sur ce sujet.

ÉTUDE DE LA DISSOCIATION CHIMIQUE DE L'AMIDON

On sait que la dissociation hydrolytique acide à 100° de l'amidon $(C^6H^{10}O^5)^n$ aboutit à la formation directe d'un hexose : le glucose, tandis que par hydrolyse fermentative à 35-40°, sa désagrégation ne fournit comme terme ultime qu'un biose : le maltose (Payen et Persoz).

En s'appuyant sur ces notions anciennes, les classiques ont été amenés à considérer l'amidon, colloïde de poids moléculaire élevé, extrêmement répandu chez les végétaux, comme formé par l'union de longues chaînes de glucose, effectuée avec perte de molécules d'eau, suivant la forme :



ou en développant :



De plus, l'étude de l'hydrolyse fermentative par la réaction d'adsorption de l'iode et par la réduction de la liqueur de Fehling a permis à ces mêmes auteurs de ranger de la manière suivante les phases successives de la dissociation amylytique:

RÉACTION A L'IODE	RÉDUCTION DE LA LIQUEUR DE FEHLING	PHASES
+ (Coloration bleue)	O	Amidon
+ (Coloration violette)	O	Amidon + amylo-dex-trines
+ (Coloration rouge-brun)	O	Amidon + erythro-dex-trines.
—	+	achroodextrines + maltose.

Ainsi, on admettait l'apparition de produits intermédiaires : les dextrines, puis finalement la formation de maltose capable d'être transformé, dans certains cas, en glucose par un nouveau ferment : la maltase.

Très nombreuses furent les recherches entreprises sur les dextrines.

Par des déterminations viscosimétriques, Biltz a été conduit à attribuer le poids moléculaire de 10.000 aux amylo-dex-trines, de 6200-7000 aux erythro-dextrines et de 3700 aux achroodextrines.

D'après Pictet, l'amylo-dex-trine, élément fondamental de l'amidon soluble, serait 6 fois anhydride de glucose. Les achroodextrines seraient des trihexosanes. En réalité, une seule de ces substances a pu être isolée, quoique encore impure : c'est l'achroodex-trine (Lintner, Pringsheim, Sjöberg, Kuhn). Elle résisterait à l'action de certaines amylases, en particulier celle des semences non germées. Ces recherches ont finalement conduit les auteurs modernes à n'envisager ces substances que comme des phases intermédiaires du processus, mais non comme des individualités chimiques définies.

Mais sont-ce les seuls produits intermédiaires signalés ? Différents auteurs ont également décelé un diglucosane (Kuhn) des tétrahexosanes et des hexahexosanes dont la polymérisation aboutirait à la formation des dextrines et de complexes de poids moléculaire variant de 50.000 à 200.000 ; enfin, un biose : le dextrinose (Pictet), et un trisaccharide (Ling et Nanji).

Par dissociation chimique de l'amidon et de ses dérivés : chauffage à 200° avec la glycérine ou acétylation, Pringsheim a trouvé deux éléments fondamentaux : un dihexosane $C^{12}H^{20}O^{10}$ et un trihexosane $C^{18}H^{30}O^{15}$. Pictet a également obtenu, à partir de l'amidon soluble, un trihexosane qui, par l'émulsine, donnait du glucose et un maltosane. Mais ici, encore, Pringsheim, se basant sur les propriétés optiques différentes et l'absence de réaction à l'iode, considère ces corps comme de simples produits intermédiaires de la réaction et non comme les constituants du complexe amidon.

CONSTITUTION DE L'AMIDON

Les belles recherches de Malfitano et Catoire ont montré qu'il fallait envisager l'amidon naturel comme un complexe qui renferme deux substances :

un non-électrolyte, l'amylose,

et des phosphates et silicates alcalino-terreux, dont les ions PO^4 et SiO^4 sont masqués en totalité, les cations ne l'étant que partiellement.

Maquenne et Roux ont réussi, par électrodialyse, à séparer du grain d'amidon deux substances :

l'une interne, l'amylose (75-80%),

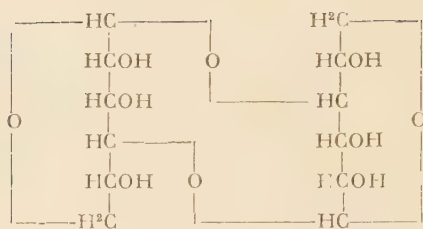
l'autre externe, l'amylopectine (20-25%), qui forme l'enveloppe du grain.

Cette séparation a pu être également effectuée par d'autres méthodes ; nous décrirons plus loin celle de M^{me} Gruzewska.

Samëc et Ling l'ont réussie par simple lavage à la température de -10° .

On s'est préoccupé alors de différencier les propriétés chimiques et physico-chimiques de ces deux substances.

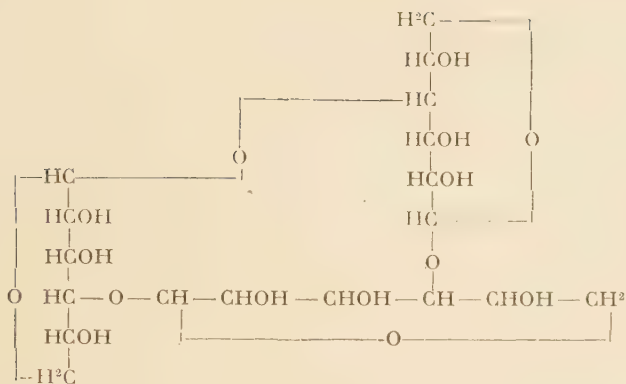
Colorée en bleu par l'iode, l'amylose est soluble dans l'eau surchauffée et les alcalis ; de plus, elle précipite de ses solutions spontanément ou par le froid : c'est le phénomène de la rétrogradation décrit par Maquenne et Roux ; toutes ces propriétés seraient dues au fait que cette substance est entièrement dépourvue d'électrolytes. Facilement hydrolysée par l'amylase ou l'émulsine, elle ne donne pas de dextrines, mais seulement des bioses. D'après Pringsheim, elle serait identique à l'isolichénine ou amidon des lichens. Samëc et Mayer lui attribuent le poids moléculaire de 80.000 et Pringsheim se basant sur le produit d'hydrolyse lui attribue la formule suivante :



Amylose.

Colorée en rouge par l'iode, l'amylopectine est insoluble dans l'eau et les alcalis ; elle se gonfle simplement et donne à l'empois sa consistance épaisse particulière. D'après Samëc, l'amylopectine contient toujours des phosphates et silicates alcalino-terreux et peut être considérée comme un éther phosphorique de l'amylose : pour 350 parties d'hexosane il y aurait 3 parties seulement de P^2O^5 ; le nombre des atomes de silice est 10 fois plus petit que celui des atomes de P dans l'amidon de pommes de terre, il est la moitié dans l'amidon de maïs. Son poids moléculaire varierait de 130.000 à 140.000 d'après Samëc et Mayer. C'est à la présence des cations, en particulier ceux de K' et de Ca'' que seraient dues, d'après Zwikker, les propriétés colloïdales particulières de ce composé : solubilité, gonflement, viscosité, tandis que Malfitano et Catoire en rendent responsables les acides phosphorique et silicique.

Difficilement hydrolysé par les ferments ou par les acides, ce corps se transforme en erythroamyloses, puis en achroodextrines ou dextrines-limites. Pour Pringsheim, cette hydrolyse fermentative aboutissant à la formation d'un trihexosane, nécessiterait l'addition d'un complément qui existe dans l'extract de malt frais et dans la levure. D'après Pringsheim et Samëc, l'amylopectine serait identique au glycogène, amidon animal. Elle aurait pour formule :



Annylopectine

Ces différences entre les propriétés physiques et chimiques de ces deux corps correspondent-elles à des structures différentes de la molécule ? Sont-elles simplement dues à la présence ou à l'absence d'électrolytes ou faut-il admettre pour chacune de ces substances des éléments fondamentaux différents ?

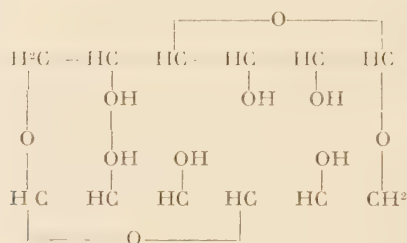
Nous avons vu que l'hydrolyse fermentative aboutit à des corps différents : dihexosanes pour l'amylose, trihexosanes pour l'amylopectine. Pringsheim a montré, en outre, que même en débarrassant l'amylopectine de ses sels, la réaction à l'iode restait différente de celle de l'amylose ; il considère ce fait comme un indice de structure chimique différente.

D'après Pictet, il y a lieu de considérer les amyloses de formule brute : $(C^6H^{10}O^5)^n$ non plus comme des anhydrides du glucose, mais plutôt comme des anhydrides du maltose : $C^{12}H^{22}O^{11}$. Par perte d'eau, il se formerait de l'anhydro-maltose : $C^{12}H^{20}O^{10}$ ou $(C^6H^{10}O^5)^2$; il existerait un composé élémentaire formé de 3 molécules d'anhydro-maltose $(C^3H^{10}O^5)^3$ qui, en se polymérisant, donnerait des corps de poids moléculaire de plus en plus élevé (60.000 à 70.000).

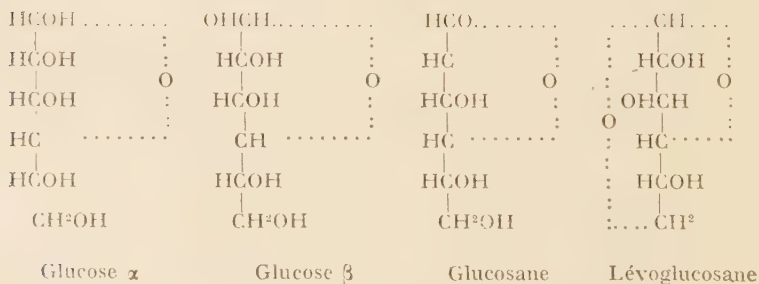
À l'appui de ces faits, les expériences de Karrer ont montré que la méthylation ou l'acétylation de l'amidon et de ses dérivés ne donne que des produits dérivés du maltose et jamais d'un autre sucre.

En ce qui concerne l'amylopectine, Pringsheim admet comme substance fondamentale un trihexosane qui, par l'hydrolyse acide, donne un trisaccharide : l'amylotriase, se formant également dans le muscle à partir du glycogène.

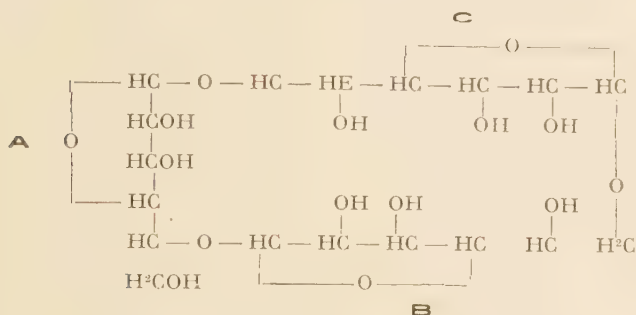
De ces faits il résulte que deux hypothèses fondamentales ont été émises sur la constitution chimique de l'amidon : l'une, soutenue par Karrer, admet comme substance fondamentale un *diamylose*, anhydride du maltose, auquel il attribue la formule suivante :



l'autre, défendue par Pictet, considère l'amidon comme un anhydride du glucose. Elle s'appuie sur l'expérience suivante de Pictet et Sarrazin : par distillation sèche de l'amidon, sous pression réduite, ces auteurs ont obtenu avec un rendement élevé, un corps cristallisable, anhydride du β -glucose : le *lévoglucosane*, analogue aux dextrines et polymérisable ; par fusion à 240° , il se transforme en une masse spongieuse soluble dans l'eau comme les dextrines. La constitution de ce corps de formule $(\text{C}^6\text{H}^{10}\text{O}^5)^3$ se déduirait des schémas suivants :



Mentionnons enfin l'hypothèse de Kuhn, qui admet à la base un diglucosane et celle d'Irvine pour qui l'amidon serait un anhydride de trisaccharide « associé » :



Quoi qu'il en soit, tous les auteurs sont d'accord pour admettre que les produits intermédiaires formés au cours de l'hydrolyse fermentative de l'amidon ne résultent pas de sa désagrégation véritable, mais de transformations secondaires ; ce seraient vraisemblablement des isomères des éléments constitutifs ; tandis qu'ils représentent des formes stables, il y aurait lieu d'admettre que les constituants naturels de l'amidon sont des formes instables.

Mais des divergences apparaissent chez les auteurs au sujet des produits ultimes de la réaction : tandis que pour Pringsheim et Hess, p. ex., ces substances existent préformées dans le complexe sous forme de molécules chimiques définies, Bergmann les considère seulement comme des produits de transformation des éléments fondamentaux ; ils en différaient par leur structure interne, en particulier par la position des ponts d'oxygène. Kuhn le déduit également d'expériences effectuées sur la multirotation des glucoses obtenus par l'hydrolyse de l'amidon. Il en serait de même pour le maltose, ainsi que nous le verrons dans le paragraphe suivant.

THÉORIE DE LA DISSOCIATION FERMENTATIVE DE L'AMIDON

La production de dextrines au cours de l'hydrolyse amylo-lytique avait conduit Musculus et Grüber à émettre une théorie du dédoublement de l'amidon, par raccourcissement des chaînes, en corps plus simples : les dextrines, lesquelles se transformeraient à leur tour en sucre. Pour Samec, ces transformations se feraient simultanément et le maltose apparaîtrait très rapidement dès le début de la réaction.

Les recherches modernes ont conduit à admettre une action plus complexe du ferment.

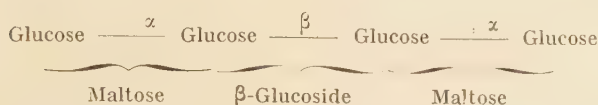
On s'est demandé si cette dissociation était l'œuvre d'un seul et même agent ou s'il fallait considérer l'amylase, à l'instar de l'émulsine, comme un complexe de plusieurs ferments : l'un désagrégeant, attaquant les liaisons d'association moléculaires, l'autre hydrolysant, véritable glucosidase, disloquant les liaisons de structure par les ponts d'oxygène. En réalité, on n'a pas encore réussi à séparer ces agents et peut-être faudrait-il admettre avec Kuhn qu'il se produit seulement une hydrolyse aboutissant à la formation de formes stables ; ces formes ayant modifié leur structure interne, ne peuvent plus s'associer entre elles et, par suite, les agrégats complexes sont décomposés.

Très intéressant est le fait signalé par Kuhn de l'existence de deux amylases différentes : l'une, l'amylase animale, est une α -amylase donnant à l'hydrolyse de l' α -maltose, dont le pouvoir de rotation spécifique, calculé par Kuhn, serait de $+160^\circ$; l'autre, l'amylase du malt (et aussi celle de l'*Aspergillus*) est une β -amylase, donnant directement (Kuhn, Euler) du β -maltose de pouvoir rotatoire $\alpha_0 = +112^\circ$. Cette dernière forme instable se transforme rapidement en la forme d'équilibre de pouvoir rotatoire : $+137^\circ$.

Cette hypothèse de l'existence possible de liaisons β , suggérée par l'action particulière de l'amylase du malt,

permet de représenter schématiquement, d'après Oppenheimer, les choses de la façon suivante :

1^o Dissociation par l'amylase pancréatique :



2^o Dissociation par l'amylase du malt :



Le fait qu'il n'apparaît pas de β -glucosido-glucose mais de l' α -glucoside pur dans l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase pancréatique fait supposer qu'il se produit, dans ce cas encore, des modifications structurales importantes. C'est pourquoi, d'après Kuhn, le maltose ne peut pas non plus être considéré comme un élément fondamental de l'amidon, mais comme un produit de formation secondaire.

Mentionnons également que le mélange des amylases salivaire et pancréatique donne directement par hydrolyse du d-glucose stable, de même qu'un ferment particulier des Bactéries : la biolase, étudiée par Pringsheim. Ce fait est intéressant, parce qu'il permet de supposer la formation intermédiaire d'un isomère de ce d-glucose, p. ex. d'un β -glucose, au cours de l'hydrolyse fermentative de l'amidon ; ce corps serait ensuite transformé en son isomère : l' α -glucose, puis en maltose.

Si l'on veut représenter ce corps sous la forme oxydique, tandis que le glucose stable est d'après Haworth 1-5 oxyde d'amylène, on peut supposer que le glucose, élément fondamental du complexe amidon, se présente comme 1-4 oxyde de butylène, ainsi que l'a suggéré Schlubach.

RECHERCHES PERSONNELLES

1. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

FERMENT

Comme ferment, nous avons employé l'amylase salivaire purifiée par la méthode de Cohnheim : la salive, prélevée dans des conditions aseptiques, est acidulée par l'acide phosphorique ; puis le liquide est neutralisé par de l'eau de chaux ajoutée goutte à goutte jusqu'à un léger excès. Il se forme un précipité de phosphate tricalcique qui retient les substances protéiques. Ce précipité, essoré, est lavé à l'eau distillée légèrement acidulée. L'amylase passe en solution. Cette solution est reprise par 5-6 fois son volume d'alcool à 95° qui précipite le ferment. Cette dernière opération est répétée un grand nombre de fois, le contact avec l'alcool n'étant jamais de longue durée pour ne pas diminuer l'activité diastasique. Le ferment est ensuite dialysé sur sacs de collodion suivant la méthode de Bierry et Schaeffer, pour le priver de sels minéraux. On obtient finalement un précipité conservé sous forme de poudre à l'abri de la lumière. Avant chaque expérience, il était mis en solution dans l'eau pure ou additionnée de thymol.

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé des solutions diluées dont les concentrations variaient de 0,001 à 0,007 ‰.

SUBSTRAT

Nous avons vu précédemment que la dissociation de l'amidon était rendue difficile par la présence, dans ce corps, d'une substance particulière : l'amylopectine, tandis que la substance interne : l'amylose, est facilement hydrolysée

(M^{me} Gruzewzka). Sherman et Baker, qui ont étudié l'hydrolyse comparative de l'amidon soluble, de l'amylose et de l'amylopectine, ont donné, pour le maltose formé et la constante de vitesse K les valeurs comparatives indiquées dans le tableau suivant :

temps (minutes)	Amidon soluble		Amylopectine		Amylose	
	Maltose % de théorique	K. 10 ⁵	Maltose % de théorique	K. 10 ⁵	Maltose % de théorique	K. 10 ⁵
30	4.4	65	4.2	62	6.1	91
60	10.8	83	7.5	56	11.3	87
90	13.1	67	11.4	58	16.8	86
120	17.0	67	14.9	58	22.6	93
150	21.9	71	18.0	57	28.2	96
180	25.7	72	21.0	57	33.7	99
210	28.8	70	24.0	57	38.7	101
240	31.5	68	26.5	56	43.2	102
360	39.0	59	34.8	51	55.0	96
1440	59.4	27	55.1	21	84.5	56

En calculant la moyenne des constantes de vitesse on obtient les valeurs :

$K_1 = 64,9$ pour l'amidon soluble ;

$K_2 = 53,6$ pour l'amylopectine ;

$K_3 = 90,7$ pour l'amylose ;

et les rapports :

$$\frac{K_3}{K_1} = 1,4 \text{ et } \frac{K_3}{K_2} = 1,7.$$

L'amylose est donc dissociée environ une fois et demie plus vite que l'amylopectine, et la différence augmente avec la durée de l'expérience de façon qu'elle peut atteindre au bout de 240 minutes, la valeur 2 ($K \cdot 10^5 = 102$ pour l'amylose, 56 pour l'amylopectine).

En raison de ces faits, nous avons choisi comme substrat l'amylose préparée suivant la méthode de madame Gruzewska (1) : dans 100 cc. d'eau froide, on délaie 10 g. de fécule

(1) Nous remercions vivement M^{me} Gruzewska d'avoir bien voulu mettre à notre disposition l'amylose préparé par elle-même.

de Pomme de terre, puis on verse le tout goutte à goutte dans 450 cc. d'eau additionnée de 15 cc. de NaOH. On ajoute 1 volume d'eau en agitant constamment. Le liquide se trouble peu à peu et prend une teinte grisâtre ; sous l'action des alcalis, les grains gonflent, puis éclatent, et l'on peut suivre au microscope cette fragmentation des grains. Au milieu d'une zone grisâtre homogène, on voit des débris plus ou moins gros des enveloppes disloquées, constitués par l'amylopectine insoluble. En ajoutant à 1 ou 2 gouttes de ce liquide 1 goutte de solution iodo-iodurée, on voit l'iode se répartir uniformément sur l'amylose, colorée en bleu, tandis qu'elle forme des plaques sombres, violacées, au niveau de l'amylopectine. La solution est ensuite neutralisée en ajoutant prudemment de l'acide acétique jusqu'à un léger excès. Puis le tout est laissé au repos pendant 24 heures. Au bout de ce temps, on sépare, par décantation l'amylose, restée en solution, du culot d'amylopectine rassemblée au fond du vase. En reprenant cette solution par l'alcool à 95°, l'amylose est précipitée. Après plusieurs lavages successifs à l'alcool-eau, et dialyse, la substance se présente sous forme d'une poudre blanche, fine, conservée à l'abri de la lumière.

Nous avons utilisé, dans nos expériences, des solutions préparées extemporanément et très diluées : 0,005 à 0,009 ‰. Ces solutions étaient mises chaque fois à l'autoclave à 130° pendant 2 heures pour permettre une dissolution complète du produit et pour éliminer toute influence microbienne.

AJUSTEMENT DE LA RÉACTION DU MILIEU AU PH OPTIMUM

Les belles recherches de Sørensen, puis de l'école de Michaelis, ont bien montré l'importance de la réaction du milieu sur l'activité des ferments.

Différents auteurs se sont préoccupés d'étudier l'optimum de réaction pour l'amylase. D'une manière générale, on admet que l'action de l'amylase salivaire s'exerce pour le mieux en milieu légèrement acide (pH 6,1 à 6,9). Michaelis, qui a étudié

plus particulièrement ce ferment, indique le chiffre de 6,7. C'est celui que nous avons adopté dans nos expériences.

Pour obtenir ce pH, nous avons préparé les solutions suivantes en utilisant les techniques de Clark et Lubs :

1^o Solution étalon de pH 6,6 : 50 cc $\text{PO}^4\text{KH}^2\text{N}/5$ pur (27,232 g %) + 17,80 cc NaOH N/5 exactement titrée, amenés à 200 cc par addition d'eau bidistillée bouillie.

2^o Solution étalon de pH 6,8 : 50 cc $\text{PO}^4\text{KH}^2\text{N}/5$ + 23,65 cc NaOH N/5, complétés à 200 cc.

3^o Solution de pH 6,7 : 50 cc $\text{PO}^4\text{KH}^2\text{N}/5$ + 20,72 cc NaOH N/5, complétés à 200 cc.

Pour vérifier l'exactitude du pH 6,7, nous avons additionné 10 cc. de cette dernière solution de 10 gouttes d'une solution à 0,02 % de bleu de bromothymol (bromothymol 0,1 g + NaOH N/20 4,3 cc + eau en q. s. pour 500 cc), qui vire du jaune au bleu en passant d'un pH < 6 à un pH > 7,6 ; nous avons examiné cet échantillon dans un comparateur, par comparaison avec les étalons de pH 6,6 et 6,8. La teinte était exactement intermédiaire entre celle des étalons.

Nos solutions d'amylose ont été préparées dans ce mélange de phosphates tampons de pH 6,7.

PROTOCOLE DES EXPÉRIENCES.

Après avoir préparé ainsi que nous l'avons exposé plus haut, nos solutions d'amylase et d'amylose mise au pH 6,7, cette dernière était répartie par fractions de 10 cc dans des tubes à essai, additionnées de 1 cc de la solution d'amylase. Un témoin ne recevait pas de ferment.

Les tubes étaient ensuite rangés dans un support métallique et portés dans un thermostat constitué par un récipient à double enceinte rempli d'eau à l'intérieur et entre les deux parois.

Toutes nos expériences ont été effectuées à la température optimale de 37°,5, l'amylase étant très sensible aux variations de température.

Pour maintenir constante la température, notre thermostat était muni d'un régulateur à mercure de Chancel, placé

à côté du thermomètre. Les variations de température les plus importantes que nous ayions observées ne dépassaient pas $\frac{1}{2}$ degré.

Les tubes, prélevés à des intervalles de temps variables, étaient plongés dans l'eau bouillante pendant 3 minutes pour arrêter l'action du ferment.

Ernström a montré, en effet, que l'amylase salivaire était déjà fortement amoindrie au-dessus de 40° et que la température mortelle du ferment, même dans les meilleures conditions, ne dépassait pas 60°. Cependant, en opposition avec ce fait, divers auteurs ont soutenu que, même après chauffage à 110°, le ferment, simplement inactivé, pouvait être régénéré par contact avec l'amidon ou par les alcalis. Mais, d'après Oppenheimer, si on a pu observer, dans ce cas, un dédoublement ultérieur de l'amidon, il s'agirait simplement d'une « hydrolyse de sels ». Biedermann a montré, en effet, que les électrolytes étaient capables de provoquer une hydrolyse de l'amidon, favorisée par la présence du ferment ou d'acides aminés. En réalité, cette dissociation n'aboutit qu'à la formation de dextrines, et il n'apparaît jamais de sucre.

Notons cependant, que d'après Wohl, l'amidon et les acides aminés protégeraient le ferment hydrolysant contre l'influence des températures élevées, la saccharification n'étant pas influencée. Ces faits viendraient, en particulier, à l'appui de l'hypothèse de l'existence de deux ferments dans le complexe amylase.

Contre le procédé d'arrêt de l'action par la chaleur, Bayliss a cependant objecté que la destruction n'était pas instantanée, mais qu'il se produisait, au contraire, une augmentation énorme de l'activité pendant les premiers instants ; ce fait serait contraire aux conclusions d'Ernström. Quoi qu'il en soit, cette objection est peu importante, puisque nous n'avons pas voulu mesurer la quantité absolue de sucre produite dans un temps donné, mais étudier les variations de cette quantité en fonction du temps.

DOSAGE DU SUCRE FORMÉ.

Pour suivre la réaction fermentative, nous avons effectué des dosages du sucre formé évalué en glucose par le procédé de Saint-Rat et Ronfaut, application de la méthode de réduction de G. Bertrand au dosage de petites quantités de sucre. Cette méthode a été récemment étudiée et appliquée au dosage du sucre sanguin par H. Bierry.

L'oxyde cuivreux, formé par l'action de la solution de sucre sur une solution alcaline d'oxyde de cuivre, est traité par une solution acide de sulfate ferrique. Le sel ferrique est transformé en sel ferreux dosé par le permanganate de potassium.

Les liqueurs utilisées sont les suivantes :

A. — *Liqueur cuivrique*

Solution de $\text{SO}^{\text{I}}\text{Cu}$ pur à..... 10 g $^{100}_0$.

B. — *Liqueur alcaline*

Sel de Seignette.....	200 g.
Soude caustique en plaques.....	150 g.
Eau distillée.....	Q.S. pour 1 litre.

C. — *Liqueur ferrique*

Sulfate ferrique.....	50 g.
Acide sulfurique.....	200 g.
Eau distillée.....	Q.S. pour 1 litre.

D. — *Liqueur permanganique*

Solution de permanganate de potassium. N/50.

Pour effectuer le dosage du sucre, le liquide est d'abord déféqué par addition d'une pincée d'acétate de plomb et de sulfate de zinc à parties égales. Par filtration sur plaque de

porcelaine recouverte d'une rondelle de papier-filtre, les matières protéiques restent sur le filtre.

Les tubes à essai contenant 5 cc. du filtrat neutralisé sont additionnés de 5 cc. de liqueur alcaline et de 5 cc. de liqueur cuivrique, fermés par des bouchons, et placés pendant 20 minutes au bain-marie à ébullition. Au bout de ce temps, on laisse déposer l'oxydule de cuivre et on passe le liquide bleu surnageant à travers un filtre d'amiante. Pour la filtration, on utilise un dispositif analogue à celui indiqué par Pregl pour les microdosages et représenté ci-contre (fig. I).

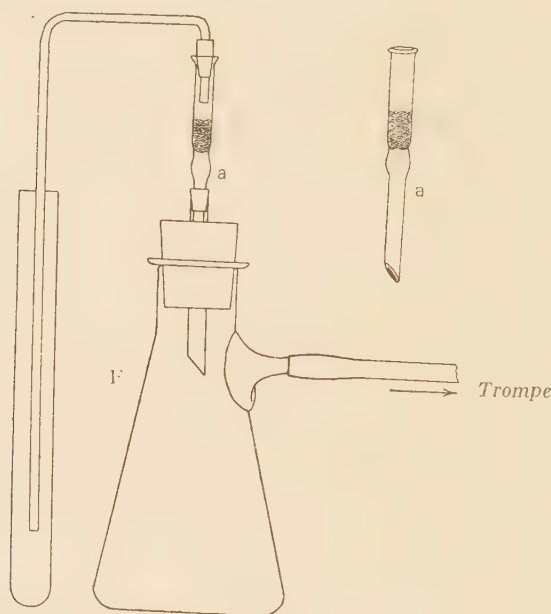


FIGURE I
Réduction au 1/3

Sur la partie étranglée du tube à filtration est disposé un tampon d'amiante fine de 1 cm. d'épaisseur. Ce tube est monté sur une fiole conique F de 60 cc. environ de capacité, portant une tubulure latérale mise en communication avec la trompe à eau. A sa partie supérieure, le tube à amiante porte un bouchon traversé par un tube fin coudé 2 fois à angle droit qui plonge à son extrémité libre au fond du tube à essai con-

tenant la solution à doser. Par une légère aspiration, on fait passer le liquide et le précipité sur le filtre. Quand tout le liquide est passé, on délaie le précipité d'oxydure de cuivre avec de l'eau distillée bouillie que l'on fait ensuite passer par aspiration sur le filtre. La fiole à filtration est alors vidée, rincée ; le précipité d'oxydure est dissous par 10 cc. environ de liqueur ferrique que l'on fait passer sur le filtre en 2 fois par aspiration, en agitant légèrement et en interrompant l'aspiration pour prolonger le contact. Enfin, quand l'oxydure est dissous, on lave encore le tube à essai et le filtre avec de l'eau bouillie en ne dépassant pas 40 cc. d'eau ; le sel ferreux est dosé par une solution de KMnO_4 contenue dans la burette de Poulenc graduée en 1/20 de cc., et préalablement titrée en cuivre au moyen de l'oxalate d'ammonium.

Des expériences de Saint-Rat et Ronfaut il résulte que, par ébullition pendant 20 minutes, 10 cc. de liqueur cuprosodique + 5 cc d'eau distillée produisent une réduction correspondant à 0 mg. 78. Ces auteurs ont donné le tableau suivant indiquant la correspondance entre les poids de cuivre et ceux de glucose.

TABLEAU DE CORRESPONDANCE

Glucose en mg.	Cuivre réduit.
0	0,78
0,5	1,83
1	2,80
2	4,86
2,5	5,86
3	6,95
4	8,89
5	11,00
6	13,20
7	15,00
8	16,87
9	18,60
10	20,44

Nous avons calculé par interpolation les valeurs intermédiaires toutes les fois où c'était nécessaire.

2. — RESULTATS

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ FERMENTATIVE DE L'AMYLASE.

Etant donnée l'extrême variabilité des préparations de ferment due à leur origine différente, aux moyens d'extraction et de purification utilisés pour leur obtention, au degré plus ou moins grand de pureté atteint, à leur inactivation plus ou moins rapide, on conçoit qu'il serait très intéressant d'établir un lien fixe entre des éléments aussi différents. De là est venue l'idée d'adopter des unités de mesure du pouvoir fermentatif, permettant de comparer les différentes préparations entre elles. Willstätter et Kuhn, qui ont particulièrement développé ce point, ont proposé récemment des « unités de ferment » représentées par l'expression :

$$U. = \frac{\text{Substrat transformé}}{\text{temps}}$$

La concentration (degré de pureté) des solutions et des préparations de ferment est exprimée par des « valeurs de ferment » représentées par l'expression :

$$V. = \frac{\text{Substrat transformé}}{\text{quant. de ferment} \times \text{temps}}$$

indiquant le nombre d'unités contenues dans une quantité définie de substance.

Pour déterminer l'activité de notre ferment, nous avons adopté la méthode décrite par Ambard et basée sur les faits suivants observés par l'auteur : par agitation d'une solution d'amylase en présence d'amidon cru, le ferment se fixe intégralement, par adsorption, sur l'amidon et s'y maintient fixé malgré des lavages ultérieurs à l'eau. L'amidon cru ne fixe en dehors de l'amylase, aucune substance réductrice.

Si, au culot obtenu par centrifugation, on ajoute un empois d'amidon, le ferment resté dans le culot abandonne son support pour se fixer sur l'empois. En mesurant la quantité de sucre formée au bout d'un temps donné, on peut calculer l'activité du ferment et la proportion de ferment fixée à l'amidon cru.

La technique indiquée par Ambard est la suivante : a 0,40 g. d'amidon cru mis dans un tube à centrifuger, on ajoute :

1° 15 cc du mélange de phosphates de pH 6,6, préparé suivant la technique de Clark et Lubs ;

2° 1 cc. de salive diluée à 0,01. .

On agite fortement pendant 3-4 minutes, on centrifuge ; on décante la partie claire et on lave de nouveau ; au culot, on ajoute 1 cc. d'empois d'amidon à 3 % préparé dans les phosphates tampons. On porte au thermostat à 35° pendant un temps fixe, en même temps qu'un tube témoin contenant 10 cc. d'empois + 1 cc. de salive à 0,01. On arrête la digestion par 4 gouttes de KOH à 25%, en ne dépassant pas 1/10 de la quantité d'amidon, transformée. Pour le dosage, on centrifuge et on prélève 5 cc. de liquide clair.

Pour nous placer dans les conditions générales de nos expériences, nous avons effectué ces opérations successives de la façon suivante :

1° Dans un tube à centrifuger taré, on verse 0,40 g. d'amidon cru pulvérisé + 15 cc. du mélange tampon de Clark de pH 6,7 + 1 cc. de la solution d'amylase à 0,03%. On agite, on centrifuge, on décante pendant 1/4 d'heure. On fait deux lavages analogues.

2° Le culot est additionné de 10 cc d'empois d'amidon en solution dans le tampon (50 cc de phosphate de K + 21,72 cc soude N/5).

3° On met le tout au thermostat à 35°, pendant 1 heure, en même temps que des tubes témoins contenant 10 cc. d'empois + 1 cc. de la solution d'amylase.

On se débarrasse de l'amidon cru et des flocons de matières amylacées en centrifugeant et en n'utilisant pour le dosage que la partie limpide du liquide.

On dose, sur une partie du liquide, le sucre formé au bout

de ce temps dans le tube témoin et dans le tube renfermant le culot d'amidon.

Poids du tube avec le culot d'amidon : 22,63 g. On a ajouté 15 cc. de liquide.

Le poids du tube est alors de :

$$22,63 + 15 = 37,63 \text{ g.}$$

On agite, on centrifuge, on prélève 12 g. de liquide clair et on dose le sucre sur cette partie.

Quantité de sucre trouvée : 11 mg.

Quantité de sucre formée dans la totalité du liquide digestif : $11 \times \frac{15}{12} = 13,87 \text{ mg.}$

Quantité de sucre formée dans le témoin : 14 mg.

ETUDE DE LA DISSOCIATION AMYLOLYTIQUE DE L'AMIDON EN FONCTION DU TEMPS

Très anciennement connue est la dissociation de l'amidon. Payen et Persoz ont, les premiers, indiqué la marche générale du processus pour l'amyrase du malt par la courbe représentée ci-dessous.

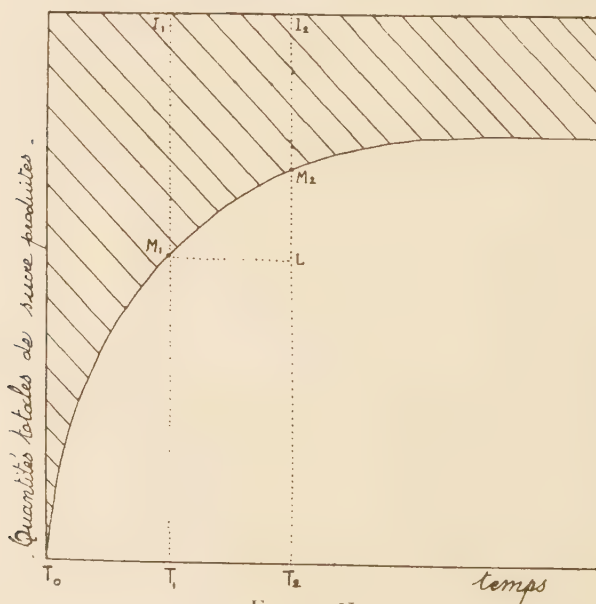


FIGURE II

Si S représente la quantité d'amidon à l'instant T_0 , à un instant quelconque T_1 , la quantité de sucre formée est : $T_1M_1 = S_1$, et la quantité d'amidon non transformée : $M_1I_1 = S - S_1$. A l'instant T_2 , la quantité de sucre formée est : $T_2M_2 = S_2$, et la quantité d'amidon restant : $M_2I_2 = S - S_2$.

La partie couverte de hachures représente les variations de l'amidon non transformé. La loi de sa décroissance est la même que la loi de croissance du sucre formé, puisque : $T_1M_1 + M_1I_1 = T_2M_2 + M_2I_2 = S = \text{Cte}$.

L'accroissement $LM_2 = S_2 - S_1$, de l'ordonnée, quand on passe de l'instant T_1 à l'instant T_2 , est proportionnel à la longueur de cette ordonnée, c'est-à-dire que l'augmentation de la quantité d'amidon transformée est proportionnelle à la quantité de sucre formée.

Cette courbe tend à devenir parallèle à l'axe des abscisses, la quantité de sucre formée dans un intervalle diminuant (v. le tableau de Sherman et Baker, p. 83) par suite de l'influence retardatrice des produits formés, comme l'ont montré divers auteurs.

A. Wohl et E. Glimm ont étudié, en particulier, la paralysie produite par diverses espèces de sucre sur l'amylase du malt ; les résultats obtenus par ces auteurs sont figurés dans le tableau ci-dessous :

200 CC. AMIDON A 1,5 % + 5 CC. EXTRAIT DE MALT.
DURÉE DE DISSOCIATION : 1 H. TEMPÉRATURE : 17°.

<i>Teneur en sucre</i>	<i>Saccharification relative de l'amidon</i>	<i>Paralyse fermentative</i>
Sans addition.	100	0
20 % de fructose.....	100	0
20 % de sucre de canne...	100	0
10 % de mannose.....	80	20
20 % de galactose.....	67	33
15 % de dextrine.....	25	75
15 % de maltose.....	0	100
10 % de glucose.....	0	100

Il résulte de ce tableau que, parmi les hexoses, l'action paralysante, nulle pour les cétooses, est marquée pour les al-

doses et que, parmi ceux-ci, il y a une différenciation en rapport avec la structure stéréochimique, le glucose étant le plus actif.

Parmi les disaccharides, seul le maltose, produit final de la réaction, a une action très forte.

D'après Ernström, V. Henri, la vitesse de réaction des amylases pancréatique et salivaire suit la réaction monomoléculaire (v. p.), et la vitesse est représentée par la formule :

$$V = \frac{dx}{dt} = K (a - x)$$

a étant la concentration initiale de l'amidon, x la quantité transformée au temps t, et K une constante.

Pour vérifier cette formule, ces auteurs ont mesuré x à des intervalles variés et calculé pour chaque expérience la constante K. Les valeurs obtenues sont sensiblement les mêmes, comme le montre le tableau suivant, emprunté à V. Henri.

SUC PANCRÉATIQUE — AMIDON A 1,5 %

<i>Temps</i>	<i>Maltose</i>	<i>Dissociation %</i>	<i>K. 10⁵</i>
44	0,130	14,1	150
78	0,206	22,4	141
119	0,307	33,4	148
186	0 420	45,6	142
218	0,483	52,5	148
385	0,693	75,2	157
484	0,740	80,4	146

Des recherches plus récentes ont montré de grandes variations à cet égard et il est apparu qu'un facteur important devait être pris en considération, à savoir la concentration du substrat.

Guigan a montré, en effet, que la dissociation des solutions d'amidon soluble de 2 à 10 % par l'amylase salivaire suivait la loi monomoléculaire, tandis que pour les solutions d'une concentration inférieure à 2 %, la vitesse diminuait progressivement au cours de la réaction.

Evan, étudiant la saccharification de l'amidon soluble par la salive diluée au 1/10, a trouvé une concentration optimale du substrat comprise entre 1,5 et 3%. Dans les solutions plus concentrées, la valeur de K diminuait fortement. Wills-tätter, Waldschmidt-Leitz et Hess ont également observé une forte diminution de la vitesse pour les solutions concentrées, comme l'indiquent les tableaux suivants :

<i>Temps en minutes</i>	<i>Mallose en mmg.</i>	$K \times 10^3 -$ $\frac{1}{t} \log. 10 \frac{a}{a-x}$
5	24.7	123
10	45.9	122
15	65	123
20	78.9	119
30	101.8	113
40	113.1	102
50	177.1	85
5	90.3	543
10	112.5	388
15	120	296
20	122.2	229

Si on représente graphiquement la vitesse du phénomène par les quantités de sucre produites dans l'unité de temps (H. Roger), on obtient la courbe représentée ci-dessous, indiquant un ralentissement progressif du phénomène au cours du temps.

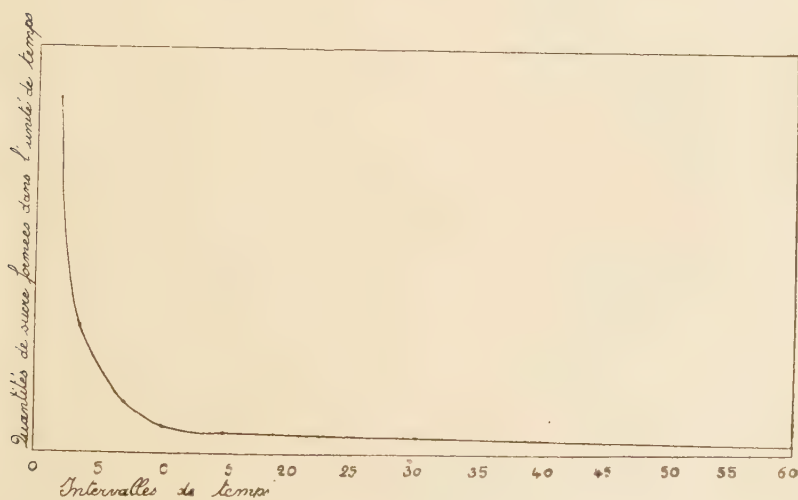


FIGURE III

Nous avons étudié la marche de ce processus pour une faible concentration du substrat et du ferment permettant de suivre de près les variations des quantités de sucre formées.

D'après les résultats obtenus, nous avons établi une *première série de courbes* donnant les quantités totales de glucose formées aux différents temps et indiquant, par conséquent, la marche de l'hydrolyse. Ces courbes (graphiques IV à IX) se distinguent de la courbe classique (fig. I) en ce

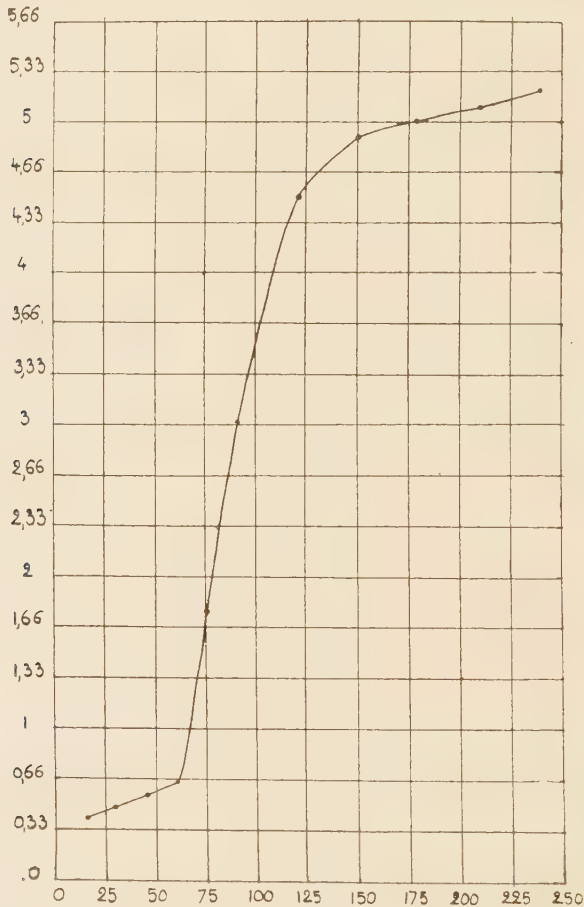


FIG. IV

FIG. IV. — En abscisses : temps en minutes.
En ordonnées : quantités totales de sucre formé en mg.
Solution d'amylase à 0,035 %.
Solution d'amylase à 0,08 %.

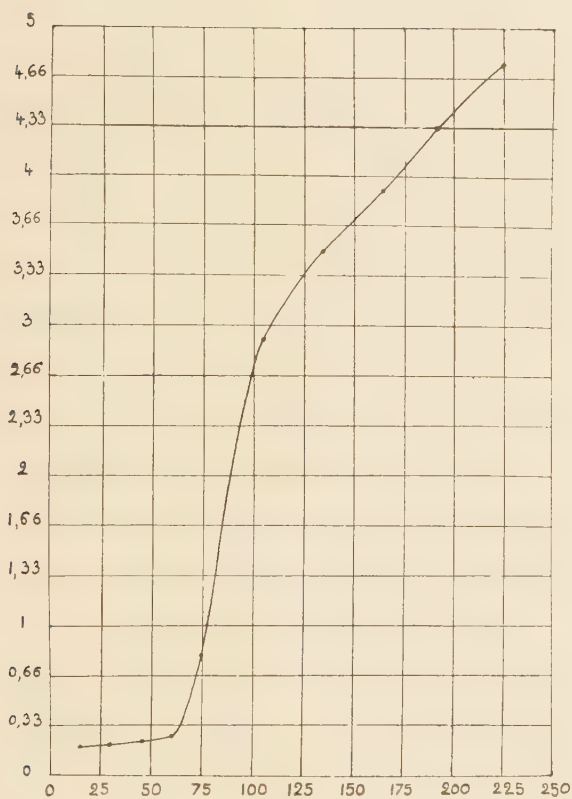


FIG. V

FIG. V. — *En abscisses : temps en minutes.*
En ordonnées : quantités totales de sucre formé en mg.
Solution d'amylase à 0,07 %.
Solution d'amylose à 0,07 %.

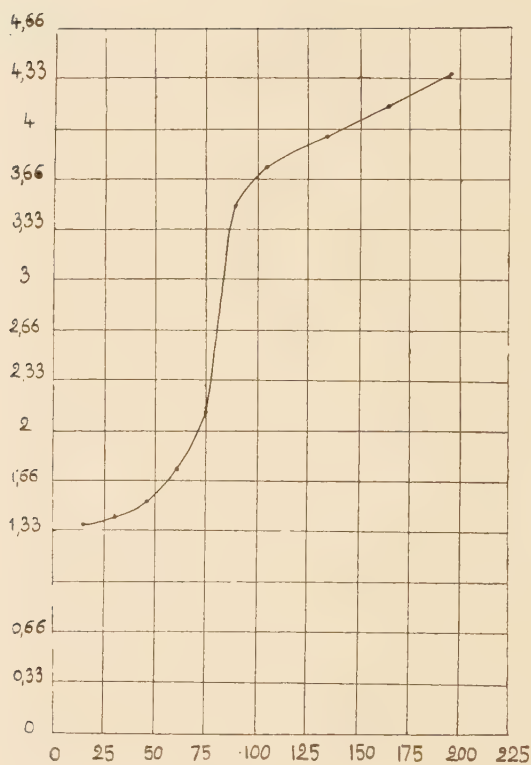


FIG. VI

FIG. VI. — *En abscisses* : temps en minutes.
En ordonnées : quantités totales de sucre formé en mg.
Solution d'amylase à 0,01 %.
Solution d'amylose à 0,06 %.

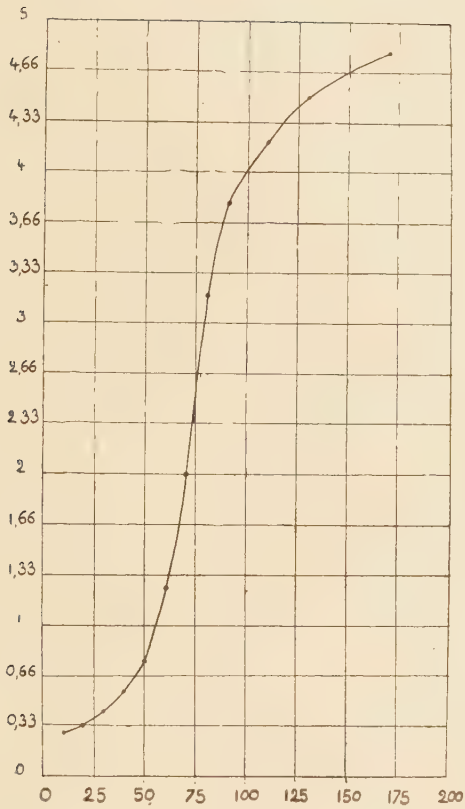


FIG. VII

FIG. VII. — *En abscisses : temps en minutes.*
En ordonnées : quantités totales de sucre formé en mg.
Solution d'amylase à 0,03 %.
Solution d'amylose à 0,075 %.

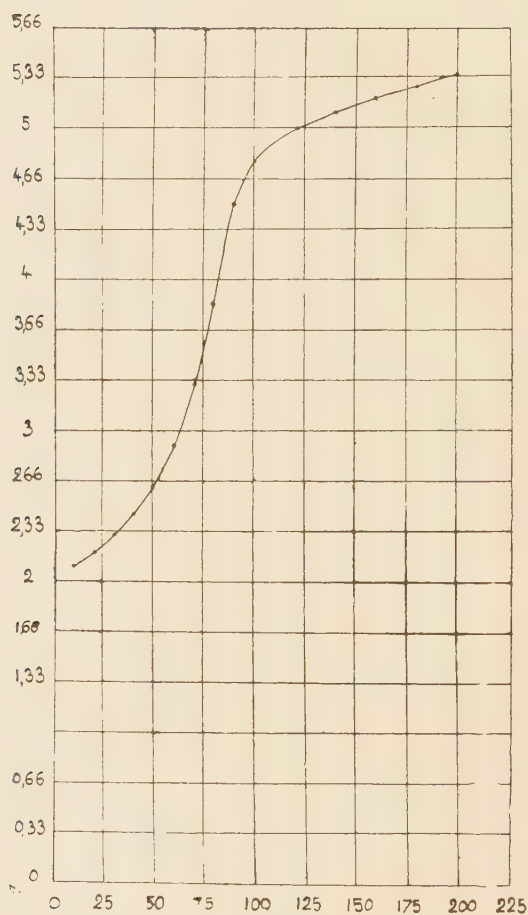


FIG. VIII

FIG. VIII. — *En abscisses* : temps en minutes.
En ordonnées : quantités totales de sucre formé en mg.
Solution d'amylase à 0,025 %.
Solution d'amylase à 0,09 %.

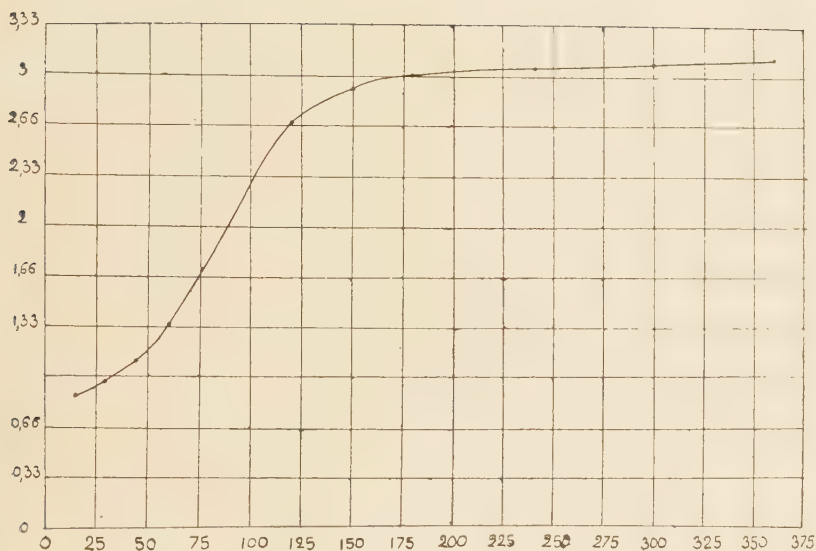


FIG. IX

FIG. IX. — *En abscisses* : temps en minutes.
En ordonnées : quantités totales de sucre formé en mg.
Solution d'amylase à 0,04 %.
Solution d'amylose à 0,05 %.

qu'elles présentent toutes, au début, un point d'inflexion plus ou moins marqué. Ce changement de direction correspond à un ralentissement du phénomène d'autant plus prononcé que l'angle formé par les deux parties de chaque courbe est plus ouvert.

En présence de ces faits nous avons construit une *deuxième série de graphiques*, indiquant les quantités de sucre formées dans l'unité de temps et représentant, par conséquent, la vitesse de la réaction (fig. IVa à IXa). Ces courbes complexes

FIG. IV a

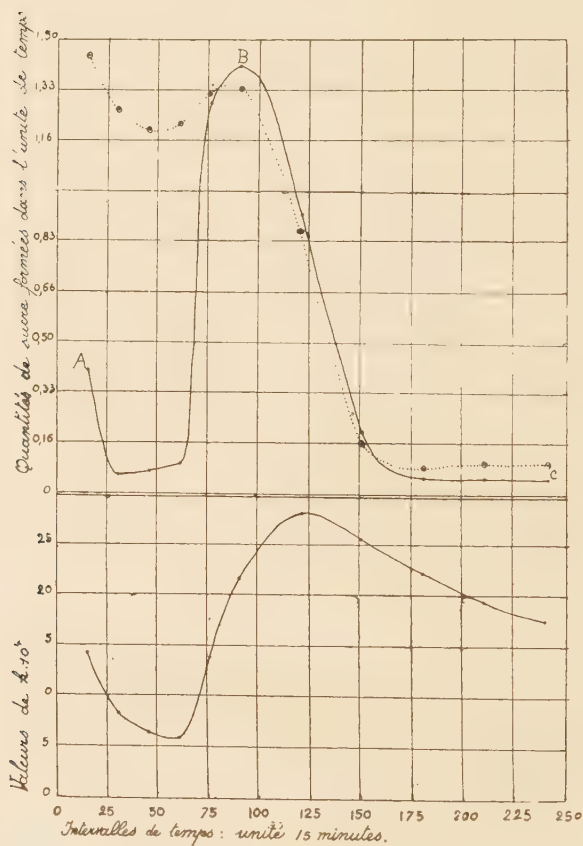


FIG. IV b

FIG. V a



FIG. V b

FIG. VI a

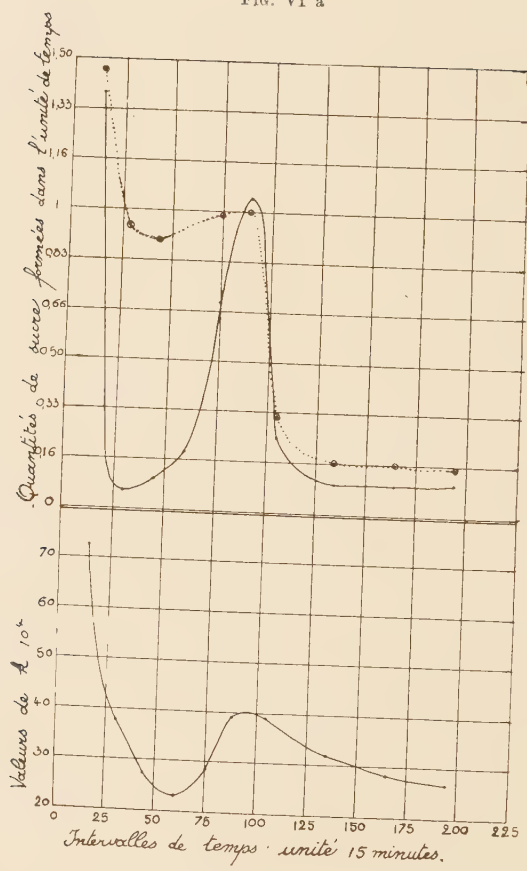


FIG. VI b

FIG. VII a

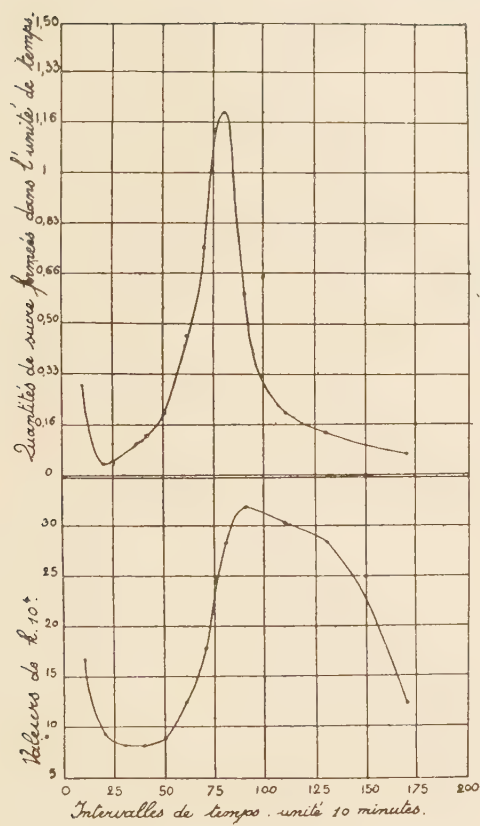


FIG. VII b

FIG. VIII a

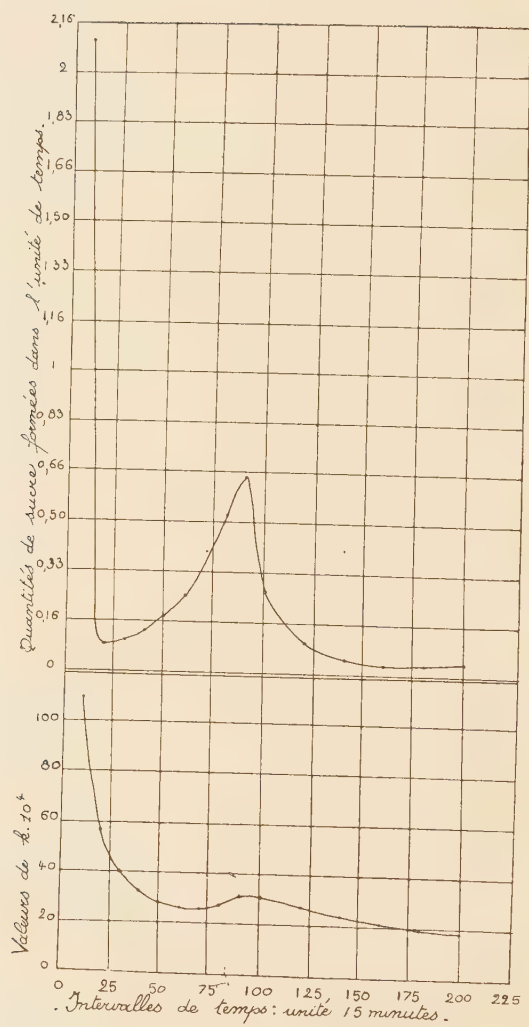


FIG. VIII b

FIG. IX a

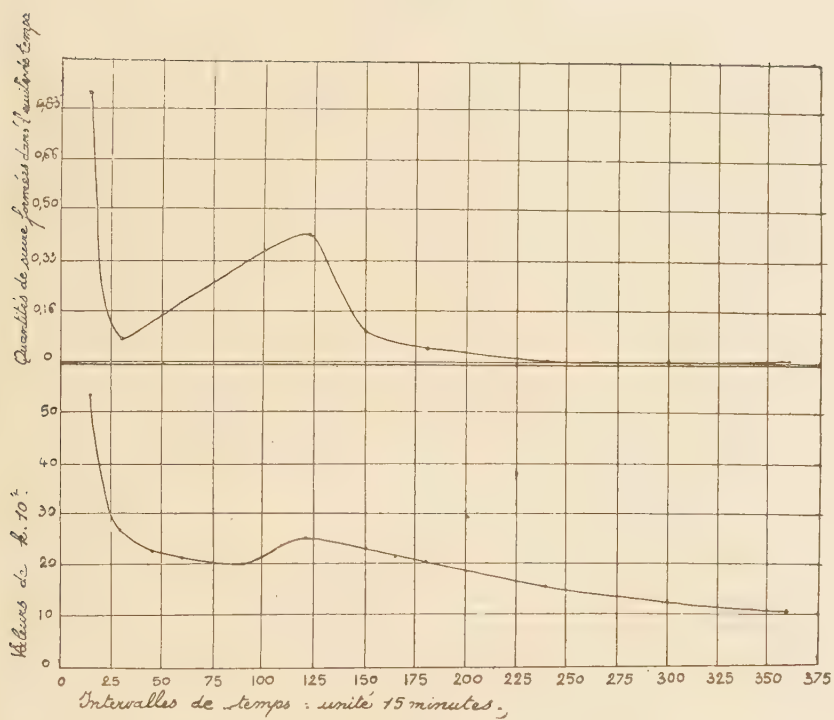


FIG. IX b

montrent que la vitesse d'hydrolyse ne diminue pas régulièrement comme l'indique la fig. II : d'abord rapide (1^{er} maximum), elle diminue ensuite, passe par un minimum à partir duquel elle augmente d'une façon notable, atteint un deuxième maximum, puis décroît progressivement suivant une courbe continue pour atteindre finalement une valeur faible, sensiblement constante.

Toutes ces courbes présentent donc deux maximums et un minimum.

Nous avons étudié leur position. Le minimum correspond au point d'inflexion des courbes de la première série ; peu variable, il est toujours situé dans le 2^e ou le 3^e intervalle de temps.

Le 1^{er} maximum correspond toujours au 1^{er} intervalle de temps ; en raison de cette fixité, nous le désignons sous le nom de « maximum absolu ».

Le 2^e maximum, ou « maximum relatif », très variable, correspond aux 6^e, 7^e, 8^e ou 9^e intervalle de temps.

Il ne semble pas y avoir de relation entre la position ou la valeur du minimum ou des maximums et la concentration en ferment ou en substrat.

En ce qui concerne la valeur relative des 2 maximums, le 2^e est tantôt inférieur (gr. VIa, VIIIa, IXa), tantôt supérieur au 1^{er} (gr. IVa, Va, VIIa).

Lorsque le 2^e maximum est inférieur au 1^{er}, plus il se produit tôt, plus il est élevé :

<i>Graphiques</i>	<i>Intervalle de temps</i>	<i>Valeur du maximum</i>
VIa	6	1,050
IXa	8	0,860
VIIIa	9	0,66

Par contre, il n'en est plus de même dans le cas où le 2^e maximum est supérieur au 1^{er} :

<i>Graphiques</i>	<i>Intervalle de temps</i>	<i>Valeur du maximum</i>
IVa	6	1,240
Va	7	1,300
VIIa	8	1,200

Ces faits montrent que le phénomène se dissocie en deux phases représentées par deux courbes différentes :

l'une, AB (fig. IVa), se rapprochant d'une parabole dont la concavité serait tournée vers le haut, l'autre BC est une courbe logarithmique analogue à la courbe classique (fig. III).

M. H. Roger a déjà insisté sur la dissociation en deux parties de la courbe d'action de l'amylase : étudiant l'action de l'amylase du jaune d'œuf sur l'amidon, cet auteur a pu analyser de très près les différentes périodes de l'hydrolyse grâce à la très grande lenteur du processus.

On l'observe également dans les résultats obtenus par Sherman et Baker sur l'amidon soluble.

Nous avons également calculé, pour toutes nos expériences, la constante de vitesse K, d'après la formule intégrée de la loi monomoléculaire :

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}.$$

Les graphiques IVb à IXb représentent les variations de $K \cdot 10^4$. Dans la 1^{re} phase de la dissociation, K n'étant pas constant, la réaction ne suit pas la loi monomoléculaire. Par contre, à partir d'une valeur maximale, correspondant au maximum relatif des courbes de la série précédente, la valeur de K devient sensiblement constante ; la loi monomoléculaire s'applique donc assez bien à la 2^e phase de la réaction.

INTERPRÉTATION

Nous nous sommes demandé à quel facteur il fallait attribuer cette marche particulière du processus observée dans nos expériences.

Nous avons insisté sur le fait que l'amylose était dépourvue d'électrolytes. D'autre part, l'amylase dont nous nous sommes servi a été privée de sels par dialyse. Or, Bierry et Giaja, Michaelis, Ambard ont particulièrement insisté sur l'inactivité de l'amylase dialysée et sur le rôle activateur de ClNa vis-à-vis de ce ferment. On serait donc autorisé à penser que le ralentissement du phénomène au début est dû

à cette absence de sels. En ajoutant aux tubes qui renfermaient 10 cc. de substrat 1 cc. de NaCl à 1‰, c'est-à-dire à une concentration voisine de celle de la salive, nous avons obtenu des courbes de vitesse ne présentant plus qu'un léger fléchissement, disparaissant même par l'addition simultanée d'acides aminés (glycocolle, leucine, à 1%) (fig. IVa et VIa en pointillé) ; ces mêmes acides, agissant seuls, diminuaient du reste légèrement le ralentissement initial. Sherman a étudié l'action de quelques amino-acides sur l'hydrolyse de l'amidon: glycocolle, alanine, phénylalanine, arginine, cystine peuvent être considérés comme activateurs. D'après Pringsheim, ils n'influenceraient la formation de maltose qu'au début de la réaction.

Les phosphates tampons n'ont aucune action sur le processus ; ils n'interviennent que pour maintenir le pH constant.

Il résulte donc de ces faits que l'amylase, même dépourvue de sels, n'est pas inactive, mais son action est plus faible que celle du ferment + ClNa. ClNa se comporterait donc comme un activateur spécifique ; l'ion Cl jouerait le rôle d'un véritable coferment de l'amylase, tout comme le manganèse pour la laccase d'après G. Bertrand, ou le zinc pour la nucléase des venins d'après Delezenne, ou le cérium dans les oxydo-réductions d'après Job. Suivant la conception de G. Bertrand, on peut supposer que ces éléments entrent dans la constitution chimique du complexe ferment considéré comme formé par l'association de deux substances :

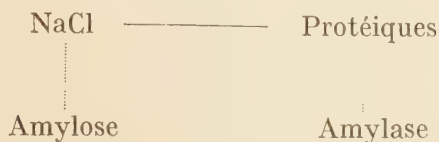
une complémentaire activante organique,

et une complémentaire active obligatoire : Cl, Mg, Zn.

Le glutathion, dipeptide lié à la cystéine ou à la cystine, jouerait le même rôle dans les phénomènes d'oxydo-réduction, d'après Hopkins.

Mais on peut également supposer qu'il se forme entre ferment et sel, ou entre substrat et sel, une « combinaison » colloïdale, de nature inconnue, et si l'on admet, suivant l'hypothèse de H. Colin, l'existence de combinaisons intermédiaires et temporaires entre ferment et substrat, il se peut que l'intervention des électrolytes favorise la formation ou la destruction de ces combinaisons en modifiant les conditions

d'absorption ; comme Oppenheimer l'a suggéré pour la lipase, il pourrait se former des « adsorptions couplées » suivant le schéma :



Suivant les conceptions de P. Girard, de Hugounencq et Loiseleur, on peut faire intervenir l'état électrique et admettre que le ferment est formé par des grains dispersés, union d'un colloïde et d'un électrolyte ; le micelle colloïdal, activé, possède un excès de charges positives ou négatives, facteur de déséquilibre permettant, suivant P. Girard, le passage d'électrons de valence de certaines molécules sur d'autres : les ions H du micelle, perdant des électrons, deviennent neutres et hydratants ; les électrons perdus, captés par Cl dans le cas de l'amylase, donneront des « ions Cl neutres », qui repasseront à l'état ionisé grâce aux ions OH, par perte d'électrons ; ce passage sur Cl des électrons provenant des ions H et OH permet l'utilisation de l'énergie intra-atomique nécessaire à la réaction. D'autre part, d'après Hugounencq et Loiseleur, suivant la nature du groupement actif privilégié, amine ou carboxyle, du colloïde amphotère, l'électrolyte fixé sur le ferment est activateur ou paralysant par blocage du groupement inactif ou du groupement actif.

Mais cette adsorption élective est réglée par la réaction du milieu. Dans le cas de l'amylase, l'ion Cl serait adsorbé pour un certain pH ; à mesure que l'on s'éloigne de ce pH optimum, l'adsorption diminuerait. Il résulte des faits observés que, dans la zone de fixation, l'ion Cl augmente considérablement l'activité fermentative pendant la 1^{re} phase du processus.

Mais si l'adsorption de l'électrolyte dépend de la réaction du milieu, inversement, d'après Michaelis, elle déplace l'optimum de réaction du ferment par le fait que son action maximale s'exerce à un pH différent ; avec le mélange tampon de phosphates, l'optimum, déplacé vers le côté alcalin, correspond au pH 6,7. C'est également l'hypothèse défendue

par Myrbäck qui admet, comme pH optimum, la valeur 6 pour l'amylase salivaire dépourvue d'électrolytes. Tandis qu'au pH 7, l'activité de ce ferment n'est que de 20 %, au pH 6 l'auteur a pu constater une activité de 60 %.

Par suite des difficultés de la préparation d'amylose, nous n'avons pu étudier l'influence des variations de pH sur l'activité de notre préparation d'amylase.

Quoi qu'il en soit, ces faits montrent combien il est arbitraire de parler d'autocatalyse dans tous les cas où il y a variation : augmentation ou diminution de la constante de vitesse, c'est-à-dire où la courbe de vitesse s'écarte de la forme classique, car cette courbe simple semble bien résulter de l'action de plusieurs composantes.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN FERMENT

Pour étudier l'influence de la concentration en ferment sur la marche de l'hydrolyse, nous avons déterminé le temps T mis par des solutions d'amylase de concentrations croissantes C,

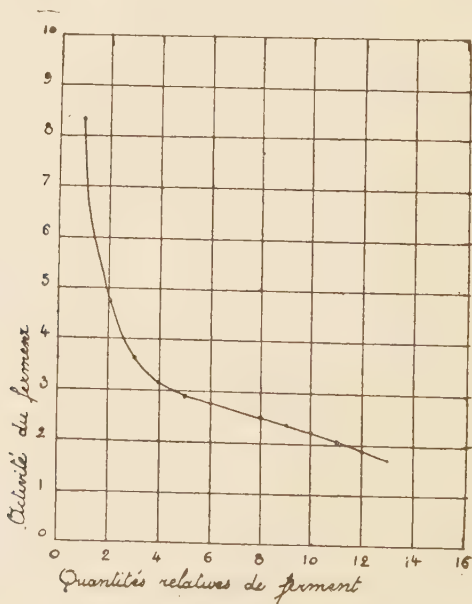


FIG. X

pour former la même quantité de sucre. Avec les résultats obtenus, nous avons calculé la vitesse moyenne du processus :

$$V = \frac{1}{T} \times 1000, \text{ et l'activité spécifique du ferment, c'est-à-dire}$$

$$\text{l'activité par unité de quantité de ferment : } A = \frac{V}{C}.$$

Le tableau ci-dessous indique les différentes valeurs obtenues, et le graphique X représente la courbe d'activité du ferment en fonction de sa concentration relative.

C	T	V	A
1	120	8,3	8,30
2	105	9,5	4,75
3	91	10,9	3,63
4	79	12,7	3,17
5	69	14,4	2,88
6	60	16,6	2,77
7	53	18,9	2,70
8	49	20,1	2,50
9	47	21,2	2,35
10	46	21,6	2,16
11	45	22,0	2,00
12	45	22,2	1,85
13	44	22,5	1,70

Ce tableau montre que, pour des solutions diluées d'amylose :

1° Les solutions d'amylase de diverses concentrations mettent des temps très différents pour effectuer la même transformation.

2° L'activité du ferment diminue quand sa concentration augmente, de sorte que de plus grandes quantités produisent un effet relativement moindre que des quantités plus faibles de ferment. Etant donné que le substrat est en quantité relativement faible par rapport au ferment,

$$\left(\frac{\text{concentration substrat}}{\text{concentration ferment}} = \frac{1}{50} \right)$$

on conçoit que la réaction ne soit pas accélérée par de plus fortes concentrations du ferment. Il faudrait, pour obtenir une accélération, un grand excès du substrat amylose pour que la totalité du ferment puisse entrer en action.

Nous nous sommes demandé de plus, si le *rapport* des concentrations du substrat et du ferment influençait la vitesse de la réaction et le pouvoir du ferment : pour le vérifier, nous avons pris la valeur moyenne de la constante de vitesse K pour les valeurs correspondant à la phase du processus qui suit la loi monomoléculaire, et nous avons calculé le pouvoir fermentatif défini d'après Willstätter et Euler par l'expression :

$$Af = \frac{K. \text{ g substrat}}{\text{g préparation d'enzyme}}$$

Af désignant le pouvoir (faculté) de l'amylase, K la constante de vitesse.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

<i>Concent. amylase</i> <i>Concent. ferment</i>	K. × 10 ⁴	Af.
10,0	18,98	189,8
12,0	19,45	243,1
22,2	22,30	509,7
25,0	24,95	623,75
36,0	25,60	921,6
60,0	32,38	1.942,8

On voit que la constante de vitesse et le pouvoir fermentatif croissent dans le même sens que le rapport entre les concentrations du substrat et du ferment. La concentration minima du substrat étant relativement faible par rapport à celle du ferment, il s'ensuit qu'une partie importante de l'amylase n'est pas utilisée : ce fait explique aisément l'augmentation de la constante de vitesse et du pouvoir fermentatif lorsque la concentration relative du substrat par rapport au ferment augmente, c'est-à-dire quand le rapport augmente.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA TRYPSINE

Très complexe est la dissociation de la grosse molécule protéique. En étudiant les phases de cette dissociation, nous nous efforcerons de montrer comment les notions précédemment développées sur la désagrégation des polyoses permettent de concevoir la dissociation des protéines comme une réaction analogue, et comment on a pu, grâce à l'étude du mécanisme des actions fermentatives, établir un lien entre des individualités chimiques aussi disparates.

CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LES PROTÉASES

Trois groupes de « protéases » attaquent la molécule protéique, à savoir deux ferments animaux, les pepsinases et les tryptases, et un ferment végétal du type de la papaïne.

D'après la nature du groupement de la molécule attaquée, ces ferments se distingueraient de la manière suivante :

1° Les *pepsinases*, dont l'unique représentant paraît être la pepsine gastrique, dissocient rapidement et énergiquement les albuminoïdes véritables : caséine, globine, glutine, collagène, chondrogène, chondrine, sérine, jusqu'au stade « peptone » et « albumose », exclusivement en réaction acide.

Par contre, la pepsine ne dissocie ni la mucine, ni la kératine, ni la gélatine, ni les peptones, ni les polypeptides. Ce ferment, désagrégeant et hydrolysant à la fois (Waldschmidt-Leitz), attaque, dans l'albumine proprement dite, le groupement amine NH_2 . D'après Northrop, d'accord avec les conceptions de Loeb, d'Hugounencq et Loiseleur, le ferment électrolyte amphotère, actif sous la forme d'anion, attaque électivement le cation d'albumine.

L'optimum d'action, variable, correspond au pH d'environ 2 (1,6 à 1,8, d'après Sørensen). Cet optimum dépendrait, d'après Northrop, du point isoélectrique du substrat : de 1,8 pour la caséine, il correspondrait à 2,2 pour la globine et la glutine. Plus ce pH du substrat est élevé, plus l'optimum du ferment se déplace vers la neutralité ; entrent donc en ligne de compte non seulement l'action optimale du ferment, mais encore la faculté optimale du substrat d'être attaqué.

Une question intéressante à ce sujet est celle du rôle de l'acide chlorhydrique. Est-ce un activateur s'unissant avec le ferment pour former une combinaison chimique définie, l'acide pepsine-chlorhydrique des anciens auteurs ? Les recherches modernes ont montré que cet acide favorisait simplement l'action du ferment en déplaçant vers l'acidité le pH du contenu gastrique. Northrop, étudiant l'influence de divers acides, a montré que le pH optimal était le même pour tous quel que soit l'état de gonflement du substrat.

2° Très différentes, à la fois par les conditions d'action et les groupements attaqués sont les *tryptases*, ferments protéolytiques proprement dits du suc pancréatique. Actives seulement en milieu alcalin, leur optimum correspond au pH d'environ 8. D'après Northrop, le groupement amine actif du ferment, de point isoélectrique 10,2, attaque électivement les anions de protéine. Donc, dans les deux premiers groupes, au point isoélectrique, l'albumine n'est pas attaquée, mais tandis que pour la pepsine, l'action commence seulement du côté acide, pour la trypsine elle s'accomplit exclusivement du côté alcalin.

Si des différences essentielles séparent les deux groupes de ferments, ils se rapprochent cependant par un lien commun, bien mis en lumière par les recherches modernes : c'est le terme ultime atteint par la dissociation qui se poursuit seulement jusqu'au stade polypeptide pour les deux groupes de ferments.

Contrairement aux opinions classiques, les belles recherches de Waldschmidt-Leitz ont montré, en effet, que le complexe « trypsine » pancréatique n'est pas un ferment unique, mais, tout comme l'émulsine et peut-être l'amylase, une préparation de deux ferments : l'un, la tryptase, obtenu à l'état pur

à partir du suc pancréatique de fistule, dissocie seulement peptones et protamines en leurs constituants simples : polypeptides, mais il est incapable d'attaquer les polypeptides, tout comme la pepsine ; cette tryptase n'existerait vraisemblablement que dans le pancréas ; l'autre, véritable éreptase, continue l'action de la tryptase pure et dissocie les polypeptides en acides aminés. Pour cet auteur, la trypsine de Kühne, sécrétée librement dans l'intestin sous forme de zymogène (Heidenhain), et obtenue à partir d'extraits de pancréas, serait une tryptase kinasée active (tryptase + peptidase) dissociant complètement le complexe protéine en ses constituants les plus simples : les acides aminés.

Kühne, puis Heidenhain, avaient constaté autrefois que si les extraits de pancréas frais étaient inactifs, par vieillissement à l'air ils acquéraient la propriété de dissocier l'albumine d'œuf ; ces auteurs avaient admis l'hypothèse d'une activation spontanée du ferment.

C'est à Pawlow et Schepalnikow que revient le mérite d'avoir découvert l'agent de cette activation particulière du ferment trypsine ; ayant observé une action activante de la muqueuse intestinale sur le suc de fistule inactif par lui-même, ces auteurs ont admis l'existence d'une kinase d'origine intestinale : l'entérokinase, agissant sur le suc pancréatique dans l'intestin même.

Sur la nature de l'action de cette kinase, deux théories classiques ont été émises :

a) la *théorie catalytique* de Pawlow, défendue par Bayliss et Starling et longtemps admise, d'après laquelle l'entérokinase serait un ferment particulier, transformant le trypsinogène en trypsine finie ;

b) l'hypothèse d'un *coferment* typique, de Hamburger et Hekma : kinase et trypsinogène s'uniraient pour former une combinaison chimique suivant la loi des proportions définies. Les expériences de ces auteurs n'ayant pas été confirmées par les divers expérimentateurs, cette théorie dut céder le pas devant la première.

Cependant, les longues recherches de Waldschmidt-Leitz devaient lui donner un regain d'actualité en lui apportant de solides arguments.

Grâce aux méthodes de séparation des ferments de Wills-tätter, cet auteur a fait une étude approfondie du mécanisme d'activation du trypsinogène.

Nous nous contenterons de résumer les résultats des très belles expériences qu'il a entreprises :

1° Le suc pancréatique déverse dans l'intestin une tryptase non activée et une prokinase, transformée là en kinase par l'érepsine.

2° Le complexe : tryptase + kinase peut être décomposé par adsorption par l'alumine, en solution acide, et aboutit à la formation réversible d'un zymogène, n'attaquant plus que les peptones.

3° En faisant agir sur le complexe trypsine, l'ammoniaque N/20, après élimination de l'érepsine par un acide faible ou par la glycérine, on obtient une kinase pure, en réaction alcaline, inactive sur les protéiques. Cette kinase, détruite à 50°, est précipitée par l'alcool. Même en l'absence du ferment, la prokinase se transforme en kinase sous l'influence de l'érepsine. L'addition, au zymogène, de très faibles quantités de kinase, l'active considérablement.

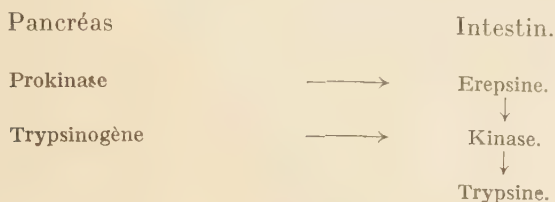
4° L'activation se produit lentement en 30 à 60 minutes. L'optimum d'action se fait en milieu neutre et l'état final du composé ne dépend que du rapport ferment à activateur. Il s'agirait donc d'une véritable combinaison chimique aboutissant à la formation d'un ferment protéolytique actif.

5° Un rôle activant différent a été attribué à diverses substances, en particulier aux sels de calcium. D'après Waldschmidt-Leitz et Mellanby, non seulement ces sels n'auraient aucune influence activante en réaction favorable, mais ils paralyseraient le ferment déjà activé.

Notons également que d'autres substances auraient une action paralysante sur la kinase, en particulier l'antitrypsine du sérum sanguin.

Ainsi, pour Waldschmidt-Leitz, la kinase serait d'origine pancréatique et non intestinale. On aurait donc affaire, non à une entérokinase, mais à une kinase générale ; bien plus, cet auteur admet même que la kinase se forme uniquement dans le pancréas.

On peut donc représenter schématiquement les choses de la façon suivante :



Si la pancréatine agit sur les protéiques, c'est qu'elle contient toujours, outre le ferment tryptase, de la substance glandulaire renfermant de la prokinase activée par l'érepsine refluee de l'intestin dans la glande.

Mais cette association de la tryptase et de la kinase a un autre but que celui de rendre plus complète la dissociation : tandis que la tryptase pure n'attaque, outre les peptones, que quelques protamines, la tryptase kinasée attaque la fibrine, la caséine, la glutine, avec une intensité variable, du reste ; certaines se montrant plus particulièrement résistantes, forment l'anti-groupe des auteurs classiques.

On sait, en effet, que Hofmeister, Kühne, se basant sur la résistance particulière de certaines protéoses à l'action des ferments, admettaient l'existence de trois groupes, dans la molécule protéique :

1° L'*hémigroupe* contiendrait tyrosine, tryptophane, cystine, acides bibasiques. Type caséine facilement dissociable.

2° L'*antigroupe* contenant acides diamminés, acides monoaminés monobasiques (leucine, glycine) et résistant à l'action des ferments pepsine et trypsine. Type mucine inattaquable.

3° Un groupe formé d'un complexe voisin d'un saccharide. On ignore, à vrai dire, les raisons de cette résistance aux ferments protéolytiques : Abderhalden, p. ex., a trouvé, dans l'édestine, un complexe inattaquable de glycocolle, proline et phénylalanine.

Toutefois, les limites entre les deux premiers de ces groupes ne sont pas très nettes, car si la dissociation de la glutine fournit des albumoses et des peptones, résistant à l'action des protéases, il en est de même pour la caséine dont la disso-

ciation est également incomplète. Il semble cependant que la présence de certains acides aminés dans le complexe protéique intervienne pour faciliter ou paralyser la dissociation ; tandis que la tyrosine, p. ex., toujours très rapidement dissociée, manque dans les peptones résistant à la trypsine, le glyco-colle et la proline semblent conférer aux substances de l'antigroupe une résistance particulière. Mais on peut supposer, avec Oppenheimer, que cette résistance différente des protéiques à l'égard des ferments tient à une structure chimique différente des agrégats moléculaires, à des liaisons plus ou moins lâches entre les divers groupements. Ainsi s'expliquerait la résistance même des tissus à l'action de la trypsine grâce à une structure particulière de l'albumine vivante ; pour les parasites intestinaux, elle serait due à la constitution chimique particulière de leur tégument aussi bien qu'à la formation d'anti-ferments spécifiques.

Très curieux est le fait que cette résistance varie avec la nature du ferment : la sérumalbumine, l'ovalbumine, p. ex., très résistantes à la trypsine ou aux protéases de tissus, se laissent facilement dissocier par la pepsine (Oppenheimer, Michaelis). De plus, un traitement préalable de la protéine par la pepsine, pendant un temps très court, suffit à supprimer la résistance. La coagulation par la chaleur agit de même. C'est donc seulement la forme la plus élevée de l'agrégat moléculaire, dans ce cas, qui n'est pas dissociée par la trypsine. Ainsi apparaît la notion d'une véritable hiérarchie parmi les ferments protéolytiques, la pepsine occupant le sommet de l'échelle, tandis que trypsine et protéases tissulaires se placent à des rangs inférieurs ; par contre, grâce à l'intervention de la kinase, ces dernières poursuivent la dissociation plus loin que la pepsine.

4^o Le « troisième groupe » de protéases proprement dites, se rencontre dans quelques tissus animaux, mais surtout chez les végétaux ; il se rapproche des pepsinases par son optimum d'action en milieu acide. Toutefois, si la dissociation se poursuit, dans ce cas encore, jusqu'au terme polypeptide, ce troisième groupe se différencie des deux autres par les substances sur lesquelles porte son action : d'une part, il dissocie faiblement les albuminoïdes vrais comme la tryptase,

d'autre part il dissocie les peptones contrairement à la pepsine.

Mais la différence réside surtout en ce fait qu'il attaque l'albumine isoélectrique, donc à un pH variable avec le substrat, généralement voisin de 5. De plus, ce groupe de ferments, dont le représentant le mieux connu est la papaïne, a un activateur spécifique : l'acide cyanhydrique. La papaïne — HCN attaque non seulement les protéines, mais même les peptones.

Il semble bien que ces trois groupes essentiels de protéases se comportent différemment au point de vue chimique : leurs groupes actifs différents attaquent électivement des liaisons différentes entre les constituants simples du complexe protéique en formant les polypeptides.

5° Mais là ne se borne pas la désagrégation des protéiques.

Chez tous les êtres vivants, en effet, la dissociation des polypeptides en acides aminés est l'œuvre des peptidases. Nous avons insisté sur la présence de ce ferment dans le complexe trypsine. L'érepsine intestinale est analogue.

D'après Waldschmidt-Leitz, l'optimum de réaction de ces ferments correspond au pH 7,8. D'après Abderhalden, il varie de 6,2 à 8,5. Sans influence sur les albuminoïdes vrais et les peptones, contrairement à Cohnheim, ces substances dissocient tous les polypeptides sauf quelques complexes contenant de la proline. Il est intéressant de remarquer, d'après Abderhalden, Pringsheim, que seuls les polypeptides naturels sont dissociés par les peptidases des êtres supérieurs, les isomères synthétiques n'étant attaqués que par quelques organismes inférieurs. C'est là un exemple bien curieux de la spécificité des ferments.

LA CONSTITUTION DES PROTÉINES

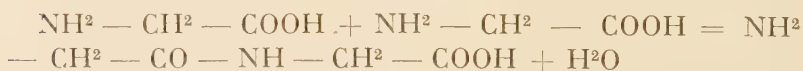
Tout comme pour l'amidon, les auteurs classiques admettaient que la molécule protéique complexe était formée de longues chaînes de carbone, portant des groupements aminés et reliées entre elles suivant des modes de liaison mal connus, ces chaînes se décomposant progressivement jusqu'au terme acides aminés, en passant par les intermédiaires : albumoses,

peptones, isolés au cours de la réaction. Ces intermédiaires étaient considérés comme des individualités chimiques plus simples que les protéines, entrant dans la constitution propre de ces corps de poids moléculaire élevé. Les beaux travaux d'Emile Fischer, en apportant des notions toutes nouvelles sur la constitution des substances protéiques, devaient susciter des conceptions nouvelles sur le mode de liaison particulier des éléments simples en agrégats colloïdaux complexes.

Par l'étude des produits de l'hydrolyse acide, E. Fischer a réussi à isoler 17 acides aminés constitutifs des protéines : glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, sérine, lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, cystine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine, proline et oxyproline.

On s'est alors proposé d'étudier le mode d'association de ces amino-acides dans la molécule protéique. En combinant entre eux les acides aminés, E. Fischer a réalisé la synthèse de polypeptides complexes, en choisissant comme mode de liaison l'union du groupement COOH de l'un avec le groupement NH^2 de l'autre.

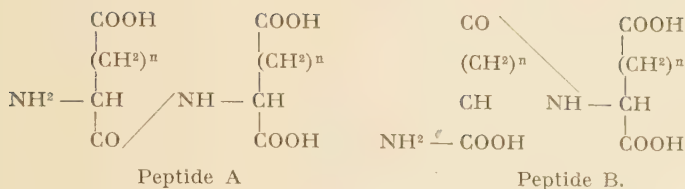
L'union de deux molécules de glycine donne, p. ex., la glycyglycine :



Cette synthèse est aisément réalisée par l'intermédiaire des chlorures d'acides correspondants. A partir de la leucine et de la glycine, E. Fischer a obtenu un polypeptide contenant jusqu'à 19 chaînes d'acides aminés.

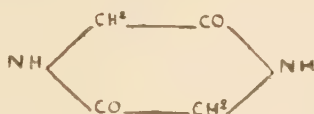
Les substances ainsi formées se rapprochent des peptones par leurs réactions chimiques et sont particulièrement sensibles à l'action des peptidases. Par hydrolyse ménagée des protéiques, on a pu isoler des polypeptides analogues, ce qui a permis de conclure à leur existence dans le complexe protéique.

Selon le carboxyle qui se soude au groupe NH^2 , les acides aminés bibasiques : a. aspartique et a. glutamique, pourraient donner, d'après Blanchetière, deux dipeptides différents :

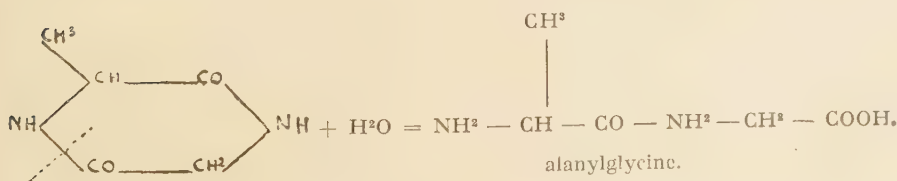
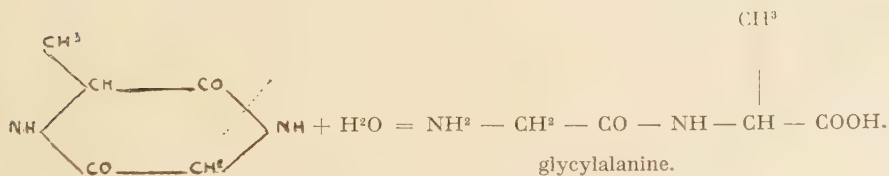


Etant donné le nombre élevé des composants, on conçoit que l'on puisse imaginer des combinaisons multiples rendant compte de la formation des protéiques à partir des acides aminés.

Abandonnant la conception classique des longues chaînes de polypeptides, de poids moléculaire de plus en plus élevé, Herzog et Abderhalden, se basant sur le fait que la protéine contient moins d'eau et la même quantité d'azote aminé que la lysine, ont émis simultanément l'hypothèse que les éléments fondamentaux de la protéine sont des « anhydrides de polypeptides », tout comme les éléments fondamentaux des polyoses seraient des anhydrides de maltose. Ces anhydrides seraient, ou bien simples : anhydride de glycine,



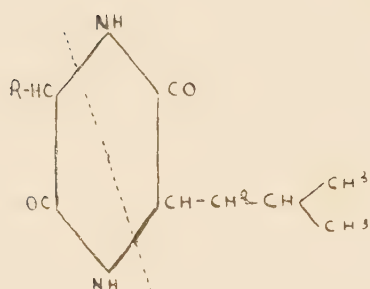
ou bien mixtes : anhydride de glycyllalanine, donnant par ouverture de leur chaîne deux peptides isomères, suivant le point de rupture de cette chaîne :



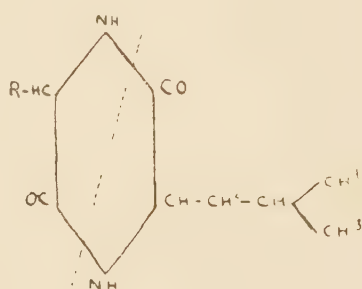
Ces anhydrides, au point de vue de leur structure chimique, représentent des dérivés de pipérazines, des dicétopipérazines.

Si on a pu prouver fréquemment l'existence de tels anhydrides au cours de la dissociation acide ou fermentative des protéiques, on n'est cependant pas autorisé à conclure, d'après Abderhalden lui-même, à leur préexistence dans le complexe protéique, car leur formation secondaire se fait très facilement à partir des peptides ouverts ou des amino-acides. Maillard a pu la réaliser par chauffage des acides aminés avec la glycérine.

Admise par Fischer, la présence de dicétopipérazines dans la molécule protéique a été défendue par A. Pictet et Cramer ; ces savants ont vu que, par distillation sèche des protéiques, l'ouverture des pipérazines aboutissait à la formation d'isocapronamide, tandis que par hydrolyse on obtenait de la leucine :



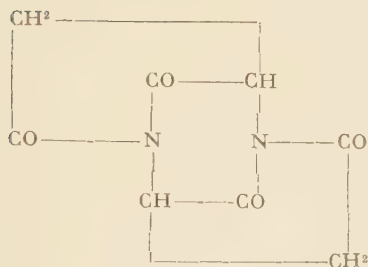
Distillation (isocapronamide)



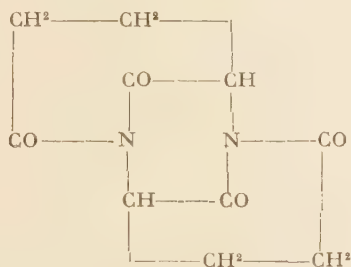
Hydrolyse (leucine)

Si l'hypothèse des liaisons amidées permet de concevoir l'existence de deux peptides différents à partir de deux acides aminés bibasiques, de même l'hypothèse d'une structure cyclique des polypeptides rend compte de ce fait.

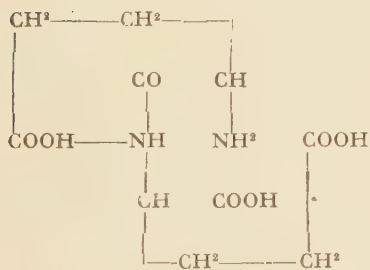
Ravenna ayant obtenu le peptide A et le peptide B à partir de l'acide aspartique, attribue à ce corps la constitution suivante :



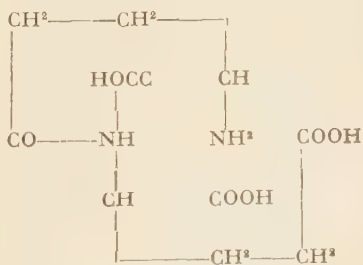
Par chauffage avec la glycérine, Blanchetière a obtenu à partir de l'acide glutamique, un composé analogue, l'acide 2 — 5 dicétopipérazine 3 — 6 dipropionique, de constitution analogue :



qui, suivant le mode d'ouverture du cycle, donnera soit le peptide A normal, soit le peptide B ou ω -peptide :



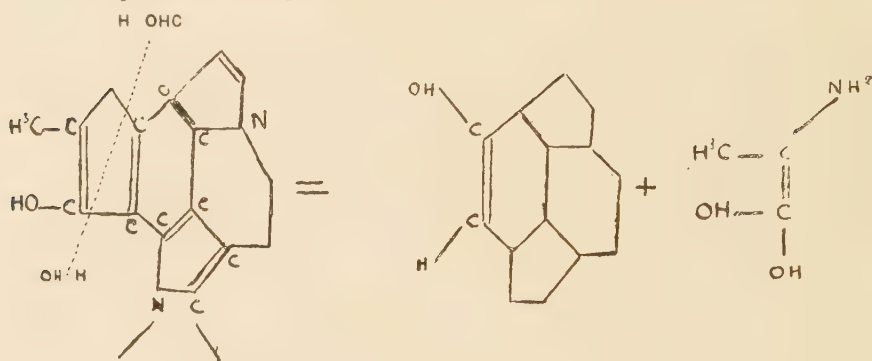
Peptide A



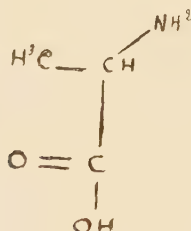
Peptide B

Signalons également l'hypothèse récente de Troensegaard qui admet l'existence, dans la protéine, d'anneaux de pyrrol

préformés par accolement de trois noyaux d'oxypyrrols sur un noyau benzénique :



ou :



A l'appui de cette hypothèse est le fait, que les protéines acétylées ou méthylées donnent par réaction des pyrrols.

Cette hypothèse rend compte de la formation d'acides aminés acycliques, aussi bien que cycliques ou hétérocycliques, de la formation de dérivés pyrroliques comme la chlorophylle, à partir des protéiques. Toutefois elle repose sur des bases expérimentales insuffisantes pour être admise sans réserves. Quoi qu'il en soit, on peut admettre que la protéine tout comme l'amidon résulte de l'association de substances fondamentales simples en agrégats colloïdaux complexes, mais il est peu probable que les dicétopipérazines fassent partie de ces éléments fondamentaux, car elles s'associent mal et résistent à l'action des protéases et des peptidases, tout comme les hexosanes résistent à l'action de l'amylase.

On a, du reste, envisagé la possibilité d'autres liaisons d'association ; d'après E. Fischer, elles pourraient se former

sur les oxhydriles des acides aminés, d'après Karrer sur les formes énoliques des dicétopipérazines. Brigl insistant particulièrement sur l'existence de combinaisons oxygénées intermédiaires et sur le fait que le rapport de l'azote à l'oxygène est supérieur à 1 pour les protéines, admet la présence dans

l'albumine de combinaisons uréiques : $\text{CO} \begin{pmatrix} \text{N} \cdots \cdots \\ \text{N} \cdots \cdots \end{pmatrix}$

D'après Bergmann, certaines formes seraient susceptibles de passer spontanément à l'état de substances à poids moléculaire élevé ; la glycylglycine, p. ex., pourrait, par dédoublement hydrolytique, se transformer en une méthyl-dicétopipérazine qui, sous l'action de l'ammoniaque, aboutirait à une forme insoluble de poids moléculaire élevé, donnant, par hydrolyse, des tétrapeptides.

Par simple chauffage de la glycylglycine, Abderhalden a également obtenu une forme insoluble.

THÉORIE DE LA DISSOCIATION DES PROTÉINES

Si l'on considère l'attaque des protéines par les protéases, on peut envisager, comme pour les polyoses, deux phases :

Ou bien, deux groupes de ferments entrent en jeu : l'un hydrolysant, hydrate l'agrégat ;

l'autre, désagrége la molécule en substances plus simples.

Ou bien, un seul ferment hydrolysant intervient, la désagrégation se faisant spontanément parce que les produits formés n'ont plus aucune tendance à s'associer. En faveur de ce fait serait, d'après Waldschmidt-Leitz, la formation simultanée d'acides aminés et de peptones au cours de la dissociation de la molécule. Dans cette dissociation, les albumoses et les peptones, tout comme les dextrines, ne sont que des produits de formation secondaire, de plus en plus simples, résultant vraisemblablement de l'association de substances fondamentales formées. D'après Waldschmidt-Leitz, les peptones ne peuvent être définies chimiquement ; ce ne sont pas

des mélanges de polysaccharides, puisqu'elles ne sont pas attaquées par les peptidases, mais seulement par les protéases ; il y aurait toutefois des exceptions, car la peptone obtenue par digestion peptique serait attaquée lentement par l'érep-sine, ce qui s'accorderait avec l'hypothèse d'une dislocation de polypeptides.

De même que pour les polyoses, deux groupes de ferments démolissent la molécule protéique.

Les protéases, analogues aux amylases, la dissocient jusqu'au stade polypeptide, tandis que les peptidases, correspondant aux maltases, dissocient les polypeptides en acides aminés libres. On conçoit aisément que ce dernier groupe de ferments ait été le mieux étudié, car il dissocie des substrats connus en produits ultimes dont la structure chimique est bien établie, tandis que bien des points du mécanisme des protéases sont encore inconnus.

EXPÉRIENCES PERSONNELLES

FERMENT.

Comme ferment, nous avons utilisé la pancréatine préparée par M. O'Bailly. Ce ferment possède les trois actions du suc pancréatique : tryptique, lipasique et amylolytique.

Nous appuyant sur les conclusions de Waldschmidt-Leitz, précédemment développées, à savoir que la pancréatine, tryptase kinasée, agit directement sur les protéiques, nous avons utilisé ce ferment sans kinase. Son pouvoir tryptique est considérable, puisqu'en solution à 0, 00001, il est encore actif sur une solution de gélatine à 5 %. La préparation, conservée à l'obscurité, était mise en solution dans l'eau distillée bouillie, à chaque expérience.

SUBSTRAT.

Nous avons étudié l'action de ce ferment sur deux substrats :

1° La gélatine préparée suivant la méthode de Fermi, avec le mélange suivant :

gélatine	5 g.
thymol	0,1 g.
eau distillée	q.s.p.100 cc.

Ce mélange stérilisé pendant 1 heure à 110° est ensuite filtré sur papier Chardin et mis au pH voulu.

2° La caséine en solution à 1 % dans l'eau distillée bouillie; la dissolution se faisant assez mal, nous l'avons préparée, de préférence, dans des solutions de soude additionnées de thymol ou dans une solution de fluorure de sodium à 1 %.

AJUSTEMENT DU MILIEU AU PH OPTIMUM.

Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, on ne saurait parler d'un optimum d'action absolu pour les protéases en général, le pH optimum dépendant à la fois du ferment et de l'état physico-chimique du substrat.

Pour la trypsine, divers auteurs ont indiqué, p. ex., les chiffres suivants pour les différents substrats :

Caséine.....	8,6	} Northrop.
Edestine.....	8,6 à 10	
Hémoglobine.....	8,4 à 9,2	
Fibrine.....	8 à 8,6	Long.
Collagène.....	5,9	Thomas et Seyman-Jones.
Gélatine.....	8,2 à 8,7	Waldschmidt — Leitz.

Michaelis et Davidsohn, Sørensen admettent comme pH optimum le chiffre 8. C'est celui que nous avons adopté dans nos expériences.

L'ajustement du substrat au pH optimal a été fait par la méthode colorimétrique. 10 cc de la solution de gélatine étaient additionnés de 0,5 cc d'un indicateur polychrome : le rouge de phénol à 0,01 %. (0,1 g. rouge de phénol dissous à chaud dans un peu d'eau additionnée de 5,7 cc solution de soude N/20, puis complétée à 1.000 cc.). Les indicateurs polychromes sont caractérisés par le fait que la molécule non ionisée [HA] et l'ion libre [A⁻] n'ont pas la même couleur.

Le tube de gélatine est placé dans un comparateur et additionné d'une solution de soude N/20 exactement titrée, jusqu'à ce que l'on obtienne une teinte intermédiaire entre celles des deux étalons de pH immédiatement inférieur et supérieur au pH désiré, préparés avec des mélanges de phosphates tampons, suivant la technique de Sørensen. Les tubes étaient disposés de la manière suivante dans le comparateur.

I Etalon de pH. 6,9	II Eau pure	III Etalon de pH. 8,1
IV milieu sans indicateur	V milieu + indicateur	VI milieu sans indicateur.

Connaissant le volume n de NaOH N/20 nécessaire pour amener 10 cc du milieu à la réaction voulue, on calcule le nombre de cc de NaOH à ajouter au substrat, et on vérifie le pH par un nouvel examen.

Le substrat était ensuite réparti par fractions de 10 cc dans des tubes additionnés de 1 cc de pancréatine à 0,0001, placés dans le thermostat déjà utilisé pour l'amylase, à la température de 37°,5 en même temps qu'un tube témoin dépourvu de ferment ; prélevés à des intervalles de temps variables, ils étaient plongés dans l'eau bouillante pour arrêter l'action du ferment. On a montré, en effet, que l'action de la trypsine, en réaction optimale, diminuait rapidement à partir de 60° pour cesser complètement à 75-80°. La courbe II de la fig. XII montre un exemple de la diminution du pouvoir fermentatif sous l'influence d'une température élevée : 65°, au pH 8 ; la courbe III montre qu'en réaction alcaline, la destruction est fortement accélérée : au pH de 8,2, l'action d'une même quantité de ferment ne produit plus qu'une faible dissociation de la gélatine à une température qui ne dépasse pas 45,5° ; on voit que, dans ce cas, l'influence exercée par les facteurs extérieurs : température et réaction du milieu sur le ferment, est la somme de deux actions paralysantes.

MÉTHODES PERMETTANT DE SUIVRE LA MARCHÉ DE L'HYDROLYSE FERMENTATIVE.

Deux buts différents peuvent être poursuivis dans l'étude de l'action tryptique :

1° La détermination de la nature chimique des produits formés au cours de la réaction.

2° L'étude de la vitesse du processus et des influences qui peuvent la modifier.

Dans le premier cas, les méthodes utilisées sont essentiellement des méthodes chimiques.

L'une des plus intéressantes est la méthode du dosage des acides aminés décrite par Sørensen et basée sur les faits suivants :

Les acides aminés possèdent des fonctions acide et amine ;

en se dissociant, ces corps amphotères, neutres vis-à-vis des indicateurs, tendent à donner des ions H et OH. Or, Schiff a montré que si l'on bloque, par la formaldéhyde, la fonction amine, le groupement NH^2 est neutralisé par transformation en NCH^2 . Le formol neutralisé est ajouté en excès au produit de la digestion tryptique, et le dérivé méthylque formé $-\text{CH} < \begin{smallmatrix} \text{COOH} \\ \text{N}=\text{CH}^2 \end{smallmatrix}$ fonctionne comme un acide monobasique et peut être dosé par titrage avec une solution de soude en présence de phtaléine.

Pour suivre la dissociation protéolytique, diverses méthodes ont été proposées :

Abderhalden, Fischer, Euler ont utilisé avec succès la mesure de l'activité optique pour étudier la dissociation des polypeptides purs.

Spriggs a utilisé la mesure des changements de viscosité des solutions de protéines, mais Bayliss a montré, en 1904, que la diminution de viscosité atteint avec une extrême rapidité une valeur limite constante, alors que le processus est encore très actif.

Grützner, Vernon, Fermi ont étudié les changements d'état physique de la fibrine et de la gélatine pendant la digestion tryptique.

Une méthode originale et démonstrative a été décrite par Mett : on remplit de blanc d'œuf frais, par aspiration, une série de tubes calibrés stériles de 15 à 20 cm de longueur, gradués en mm. On les scelle à une extrémité, puis on les plonge dans de l'eau à l'ébullition pendant 10 minutes. L'albumine se coagule. On coupe ces tubes en tronçons de 5 cm de long ; chacun de ces tubes forme un test de digestion. On les introduit dans un flacon contenant la solution de trypsine étudiée et on porte celui-ci au bain-marie à 38-40° pendant un temps déterminé, 10 à 24 heures. On retire les tubes et on mesure à la loupe la longueur d'albumine digérée et solubilisée. L'activité tryptique du liquide peut être exprimée par un chiffre qui représente le carré du nombre de mm. du cylindre d'albumine dissous. Fermi a appliqué cette méthode à l'étude de la liquéfaction de la gélatine. Après action du ferment, les tubes d'expérience sont plongés dans un bain d'eau froide

jusqu'à ce qu'un témoin dépourvu de ferment soit entièrement solidifié. Dans les tubes où la gélatine est digérée (transformée en proto- ou deutéro-gélatose, la coagulation ne se produit plus par refroidissement.

De nombreux expérimentateurs ont étudié les modifications de la conductibilité électrique au cours de la digestion protéolytique. Sjökvist a, le premier, observé une diminution de cette propriété sous l'influence de l'action de la pepsine. Oker-Blom a montré que, dans le cas de la trypsine, il se produisait, au contraire, une augmentation de la conductibilité électrique. V. Henri et Larguier des Bancels, Bayliss ont analysé plus particulièrement ce phénomène. Ces auteurs ont montré que l'augmentation de la conductibilité, représentée par une courbe régulière, allait en décroissant progressivement au cours du processus. Pour Bayliss, la cause principale de cette augmentation serait due à la production simultanée de peptones et d'acides-amino. Si la conductibilité est très basse pour certains acides-amino : glycocolle, alanine, leucine, cet auteur a constaté, par contre, qu'elle était très élevée pour les acides : a. aspartique, a. glutamique et lysine.

Sörensen, Launoy, ont particulièrement insisté sur le fait qu'il se produit, au cours de la digestion tryptique, une modification de la réaction du milieu provoquée par l'action même du ferment.

Pour V. Henriquez et Sörensen, l'augmentation de l'acidité, attribuée par Launoy à la production d'albumoses et de peptones à caractère acide, serait essentiellement liée, tout comme l'augmentation de conductibilité, à la libération d'acides-amino dès les premières phases de la réaction. Ces auteurs ont, en effet, montré que des solutions de divers acides aminés : glycocolle et glycylglycine, à teneur égale en azote, exigeaient des quantités différentes de soude pour faire virer la phénol-phtaléine ; tandis que le glycocolle n'exigeait qu'une faible quantité de soude 0,2N pour donner une réaction neutre au tournesol (1 goutte pour obtenir un pH de 6,8), pour la glycylglycine, il fallait une quantité beaucoup plus importante (5 gouttes NaOH 0,2N pour un pH de 6,8). La glycylglycine serait donc un acide plus fort que le glycocolle. Ce fait s'accorde, du reste, parfaitement avec les chiffres indiqués dans

le tableau ci-dessous pour les constantes de dissociation acide K_a et le point isoélectrique K_r des différents amino-acides et peptides, calculés récemment d'après les modifications de leurs propriétés physico-chimiques :

<i>Acides aminés et peptides</i>	<i>K_a</i>	<i>K_r</i>
Alanine.....	$1,9 \cdot 10^{-10}$	$6,1 \cdot 10^{-7}$
Alanylalanine.....	$1,9 \cdot 10^{-8}$	$3,0 \cdot 10^{-8}$
Acide aspartique.....	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$
Glycylglycine.....	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$3,0 \cdot 10^{-8}$
Glycocolle.....	$1,8 \cdot 10^{-10}$	$8,2 \cdot 10^{-7}$
Histidine.....	$2,2 \cdot 10^{-9}$	$6,2 \cdot 10^{-8}$
Leucine l.....	$1,8 \cdot 10^{-10}$	$8,8 \cdot 10^{-7}$
Leucylglycine.....	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$2,2 \cdot 10^{-6}$
Lysine.....	$1,0 \cdot 10^{-11}$	$3,0 \cdot 10^{-10}$
Phénylalanine.....	$2,5 \cdot 10^{-9}$	$4,4 \cdot 10^{-6}$
Tyrosine.....	$4,0 \cdot 10^{-9}$	$3,9 \cdot 10^{-8}$

D'une manière générale, d'après Sørensen, tous les poly-peptides se comportent comme la glycylglycine, les acides simples comme le glycocolle. Or, les polypeptides contiennent une ou plusieurs liaisons amidées — CO — NH —. Van Laar a bien insisté sur l'importance, en chimie, du phénomène de tautomérisation. On peut admettre que le groupement peptidique se présentant, en cas de réaction acide, sous la forme cétone — CO — NH — est énoisé à mesure que l'alcalinité augmente, c'est-à-dire qu'il se transforme en la forme tautomère — C(OH) = N — agissant comme un acide faible capable de fixer des ions. Pour les formes plus élevées : peptones, protéines, cette propriété ne se manifesterait que dans les liaisons peptidiques « périphériques ». La variation du pH au cours de la dissociation des protéiques s'expliquerait donc, d'après Sørensen, de la manière suivante : par scission progressive de la molécule, des liaisons « périphériques » se séparent en nombre de plus en plus grand. La digestion se continuant, il se forme des polypeptides simples, d'où augmentation des liaisons périphériques. Il est vrai que, par contre, ces éléments simples peuvent, d'une part, se doubler en acides monoaminés plus faibles ou, d'autre part, s'associer de nouveau entre eux, ces deux conditions entraînant une diminution du pouvoir des liaisons basiques.

Mais, tout au moins dans les premières phases du processus, la formation des polypeptides l'emporte, et il s'ensuit une augmentation qui décroît à mesure que la digestion progresse. V. Henriquez et J. K. Gjaldbaek, qui ont étudié comparativement le pouvoir de liaisons basiques au cours des digestions tryptique et peptique, ont observé que pour cette dernière protéase, ce pouvoir était à peu près constant, tandis que pour la trypsine, il est égal, au début, à celui de la pepsine, puis diminue progressivement pendant l'hydrolyse.

Ces auteurs ont ainsi confirmé le fait déjà connu que, pendant la digestion peptique et par l'hydrolyse acide, il se forme constamment des polypeptides, tandis que la digestion tryptique libère, outre des polypeptides au début seulement, un nombre d'amino-acides de plus en plus élevé. Il en serait de même pour la dissociation des protéines par les alcalis.

M^{lle} J. Christiansen, suivant les modifications de la concentration des ions H par les variations de teinte de la phénolphtaléine, a observé un pâlissement graduel de la teinte rouge de l'indicateur.

Nous proposant d'analyser particulièrement la phase initiale de la dissociation protéolytique, nous avons utilisé, sur les indications de M. Léon Binet, la mesure des variations de pH, telle qu'elle a été décrite par L. Hédon.

Pour cela, nous avons préparé une échelle d'étalons de pH 6,6 à 8,4 de 0,1 en 0,1, constituée par des mélanges, en proportions convenables, de solutions de phosphates de soude, en quantités croissantes (11,876 g. de phosphate disodique pur N/5, préalablement hydraté par exposition à l'air pendant 15 jours, sont dissous dans 500 cc d'eau additionnés de 45,5 cc. d'une solution de phénolsulfonephtaléine à 0,02 %, complétés à 1.000 avec de l'eau distillée) avec des solutions de phosphate de potasse en quantités décroissantes (9,078 g. de phosphate monopotassique pur N/5, dissous dans 500 cc d'eau distillée bouillie + 45,5 cc. solution de phénolsulfonephtaléine à 0.02 % complétés à 1.000 avec de l'eau distillée).

Cette série de phosphates tampons a été répartie par fractions de 10 cc dans des tubes de verre neutre calibrés dont les teintes allaient du jaune au rouge avec tous les intermédiaires.

Avant chaque expérience, nos tubes de gélatine, mis au

pH optimal de 8, étaient tous additionnés de 0,5 cc. de phénol-sulfonephtaléine. Après les expériences, les déterminations de pH ont toujours été faites à la même température que celles du début. On sait, en effet, que la température modifie la teinte des phénolsulfonephtaléines qui se déplace de 0,006 par degré, du côté acide, quand la température s'élève.

Pour effectuer les déterminations, nous cherchions, par examen au comparateur, la teinte occupée par les tubes d'expérience dans la gamme formée par la série des tubes de l'échelle-étalon.

RÉSULTATS

VARIATIONS DE LA RÉACTION DU MILIEU EN FONCTION DU TEMPS, AU COURS DE LA DIGESTION TRYPTIQUE.

Avec les résultats obtenus, nous avons établi des courbes représentant les variations de pH au cours de la dissociation de la gélatine et de la caséine par la pancréatine.

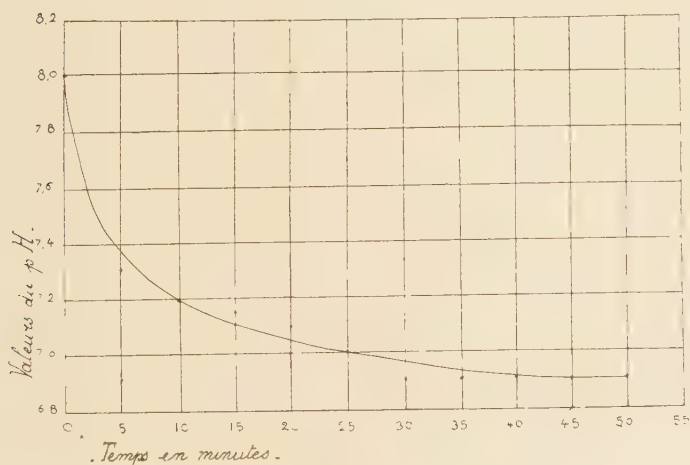


FIG. XI

Ces courbes (fig. XI, XII et XIII) mettent bien en relief le fait que l'abaissement de pH, maximum au début de la réaction, décroît progressivement jusqu'à une valeur limite à partir de laquelle le pH reste constant. Pour un pH initial de 8, nous avons trouvé, comme L. Hédon, une valeur limite voisine de 7, atteinte généralement au bout d'une heure.

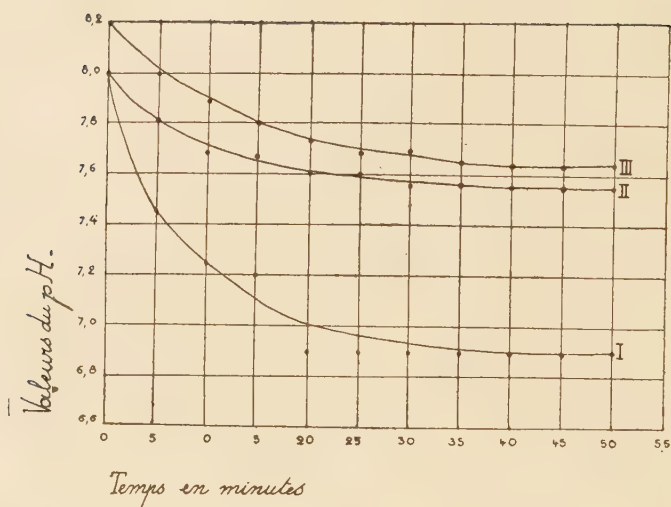


FIG. XII

Action de 1 cc. d'une solution de pancréatine à 0,0001 sur 10 cc. d'une solution de gélatine à 5 %.

pH : 8 — T° : 37°5 (I) — T° : 65° (II) — T° : 46°5 (III)

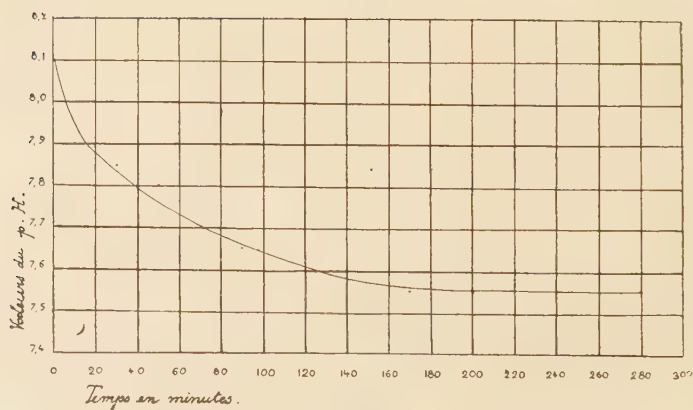


FIG. XIII

Ainsi, les variations du pH sont sensiblement parallèles aux variations de la conductibilité observées par V. Henri et Bayliss.

Nous avons calculé la constante de vitesse K, exprimée, d'après la loi monomoléculaire, par la formule :

$$K = \frac{1}{t} \log. 10 \frac{a}{a-x}$$

et la vitesse, d'après la formule :

$$V = K (a - x)$$

Les tableaux suivants représentent les valeurs différentes de ces deux facteurs et les graphiques I et II de la fig. XIV, la marche des variations de $K \cdot 10^4$, établie d'après deux de nos expériences sur la gélatine et la caséine.

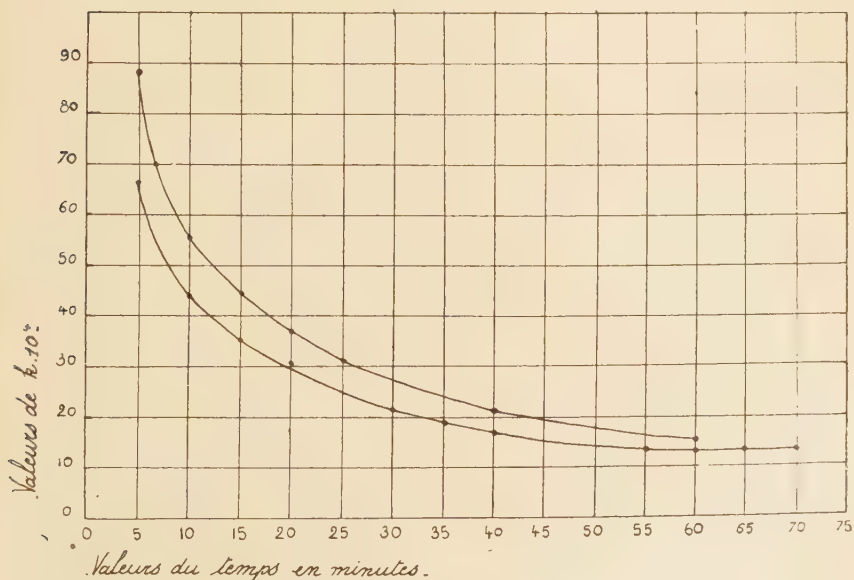


FIG. XIV

<i>Gélatine</i>		<i>Caséine</i>	
K. 10 ⁴	V	K. 10 ⁴	V
33,2	0,02554	44,0	0,03388
22,3	0,01693	27,7	0,02104
18,3	0,01375	22,3	0,01672
15,4	0,01152	18,2	0,01353
10,7	0,00795	15,7	0,01162
9,3	0,00693	10,5	0,00775
8,5	0,00627	7,5	0,00549
6,7	0,00492		
6,6	0,00481		
6,6	0,00477		
6,5	0,00471		

On voit que K et V décroissent régulièrement au cours de la dissociation protéolytique.

Des résultats du même ordre ont été publiés par Bayliss, qui a obtenu, dans une expérience, pour K. 10⁴, des valeurs décroissantes de 79 à 7.

La loi monomoléculaire ne peut donc s'appliquer à ce processus.

DISSOCIATION COMPARATIVE DE LA GÉLATINE ET DE LA CASÉINE.

En comparant les activités du ferment pour ces deux substrats, nous avons été frappée par ce fait que l'abaissement de pH est considérablement plus marqué pour la gélatine que pour la caséine, bien que le rapport des concentrations : $\frac{\text{substrat}}{\text{ferment}}$ soit 50 fois plus grand dans le premier cas

$\left(\frac{0,05}{0,00001} = 5.000 \right)$ que dans le second $\left(\frac{0,01}{0,0001} = 100 \right)$. D'autre part, nous avons observé que la pancréatine, encore active sur la gélatine à la concentration de 0,00001, n'attaquait pour ainsi dire plus la caséine à une concentration de 0,0001.

A quoi faut-il attribuer cette différence ?

L'activité du ferment varie-t-elle suivant la nature chimique du substrat ?

Les variations de l'acidité du milieu correspondent-elles à la nature chimique différente des produits formés ?

Ou bien l'optimum de réaction est-il tout simplement différent pour les deux substrats ?

La première hypothèse s'accorderait mal avec les conceptions classiques, assez peu certaines du reste, admettant que la caséine, substance de l'hémigroupe, est plus facilement disloquée par la pancréatine que la gélatine, appartenant à l'antigroupe.

En faisant agir 1 cc. de pancréatine, à 1/5.000 simultanément sur la gélatine et la caséine, nous avons observé un abaissement de pH plus grand que celui obtenu par action du ferment sur un seul substrat, la limite atteinte étant de 6,4 au bout de 2 heures. Ce fait confirmerait bien l'hypothèse d'une attaque élective du ferment sur des groupements différents des substrats.

Peut-être y aurait-il lieu d'admettre, dans la gélatine, l'existence, entre les éléments fondamentaux, de liaisons plus lâches et partant plus facilement rompues, que dans la caséine ou, suivant Michaelis, la formation plus facile de combinaisons entre ferment et substrat.

Si par l'hydrolyse acide, la dissociation totale de la gélatine aboutit surtout à la formation d'acides aminés bibasiques forts, il faudrait admettre, d'après la deuxième hypothèse, que l'hydrolyse fermentative se comporte tout autrement : ou bien les produits ultimes formés ne sont pas les mêmes, ou bien le processus, différent dans la première phase de la réaction, aboutit surtout à la formation de polypeptides pour la gélatine et à celle d'acides-amino-acides simples pour la caséine.

Singulier est le fait que, par addition de quantités très faibles de kinase (1 cc. d'une solution à 0,00001), nous n'avons constaté qu'une faible accélération de la réaction pour la gélatine ; pour la caséine, par contre, l'abaissement du pH était augmenté d'une façon appréciable et notablement accéléré.

Nous avons vu, d'autre part, que l'optimum d'action varie suivant le substrat attaqué. D'après Northrop, il correspondrait pour la caséine à un pH de 8,6 et pour la gélatine à un pH d'environ 8.

Les courbes II et III de la fig. XV montrent les variations de la réaction au cours de l'hydrolyse de la caséine à un pH de 8,1 et à un pH de 8,4.

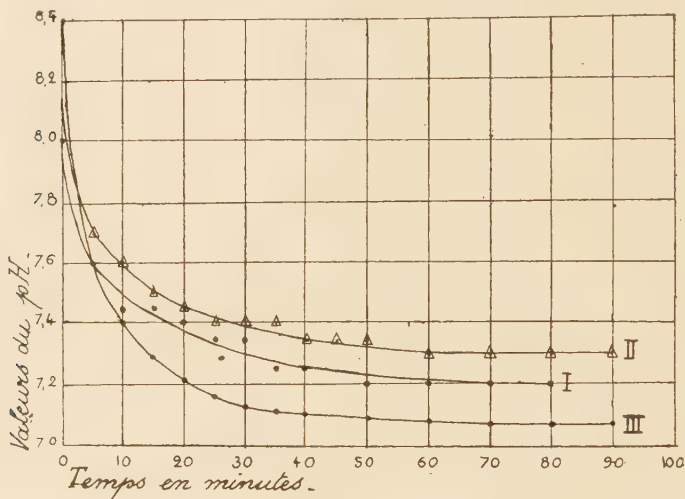


FIG. XV

Action de 1 cc. de pancréatine à 0,001 sur :

10 cc. d'une solution de caséine dans NaOH N/20 (I) ;

10 cc. d'une solution de caséine dans

FN₁ à 1 % : pH initial : 8,1 (II)

pH initial : 8,4 (III).

On voit que la réaction est beaucoup plus rapide, en effet, dans le second cas.

En ce qui concerne la caséine, nous avons observé le fait particulier suivant : en solution dans la soude N/20 ou le fluorure de sodium à 1 %, la dissociation initiale est beaucoup plus rapide que dans l'eau pure. J. Loeb a montré que par dissolution de la caséine dans la soude, il se produisait un éclatement des grains dû, d'après Quincke, à l'abaissement de la tension superficielle au niveau de la surface des grains ; en suivant cette dissolution au microscope, on voit d'abord les grains gonfler jusqu'à un certain volume, puis disparaître très rapidement. On peut donc supposer que la dissolution alcaline de la caséine modifie l'état physico-chimique du corps, favorisant de ce fait, d'après Michaelis, sa dissociation protéolytique.

En ce qui concerne le fluorure de sodium, on a signalé, depuis longtemps, une action activante des fluorures sur les ferments protéolytiques, activation imputable à l'ion F^- .

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR LE PROCESSUS.

Nous avons étudié, dans ce but :

1° L'influence des variations du pH initial sur l'activité du ferment.

2° L'influence des variations de pH au cours de la réaction.

En faisant varier le pH initial, nous avons observé les faits suivants :

1° Pour la gélatine, l'optimum d'action correspondrait au pH 8.

2° L'activité du ferment décroît rapidement à mesure que l'on s'éloigne de l'optimum,

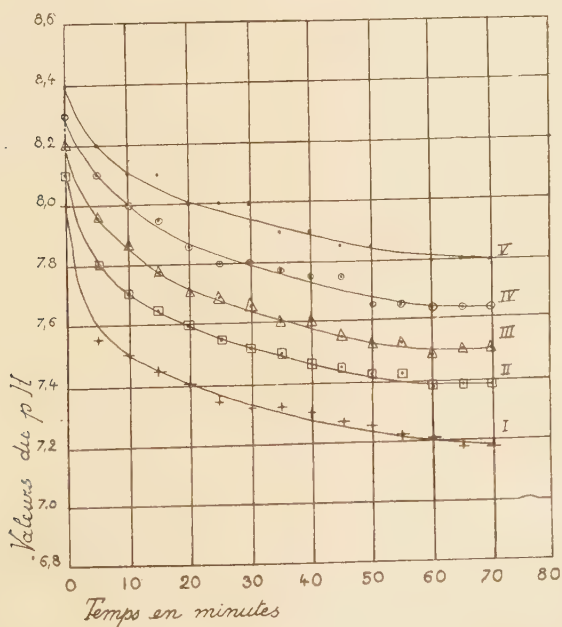


FIG. XVI

3° La diminution de l'activité du ferment, rapide, pour des pH inférieurs à 8, est surtout très brusque pour des pH supérieurs à 8.

La figure XVI représente les variations de l'activité de la pancréatine sur la gélatine pour des pH supérieurs à 8. On voit que la diminution de l'activité porte aussi bien sur la partie initiale que sur la limite atteinte.

Nous avons signalé d'autre part que cet optimum est plus élevé pour la caséine (fig. XV), l'activité du ferment diminuant rapidement à mesure que le pH s'abaisse.

L'équilibre du pH étant rapidement atteint, nous nous sommes demandé si les variations observées au cours de la réaction n'étaient pas responsables de cet arrêt de la réaction. Des dosages comparatifs de l'acidité libérée par le formol, après addition au substrat de mélanges de phosphates tampons nous ont montré, pour la première partie du processus, des variations sensiblement parallèles à celles du pH.

D'autre part, dans une autre série d'expériences, après atteinte de l'équilibre (pH 7), nous ramenions le pH à sa valeur initiale de 8. De nouvelles mesures, faites au bout d'une heure, ne nous ont pas montré de nouvelles variations.

Au bout de 2 heures, l'abaissement de pH ne dépassait pas 0,1 à 0,15, et au bout de 10 heures, le pH était inchangé. Nous avons observé les mêmes faits avec la caséine.

Il semble donc résulter de ces faits que les variations du pH, pendant la première partie tout au moins du processus, n'influencent pas la valeur limite de l'abaissement de pH.

INFLUENCE DES PRODUITS DE LA RÉACTION.

Il est incontestablement admis que les produits des réactions fermentatives exercent une influence paralysante sur le phénomène.

Pour étudier ce fait, dans le cas de la trypsine, nous avons fait l'expérience suivante :

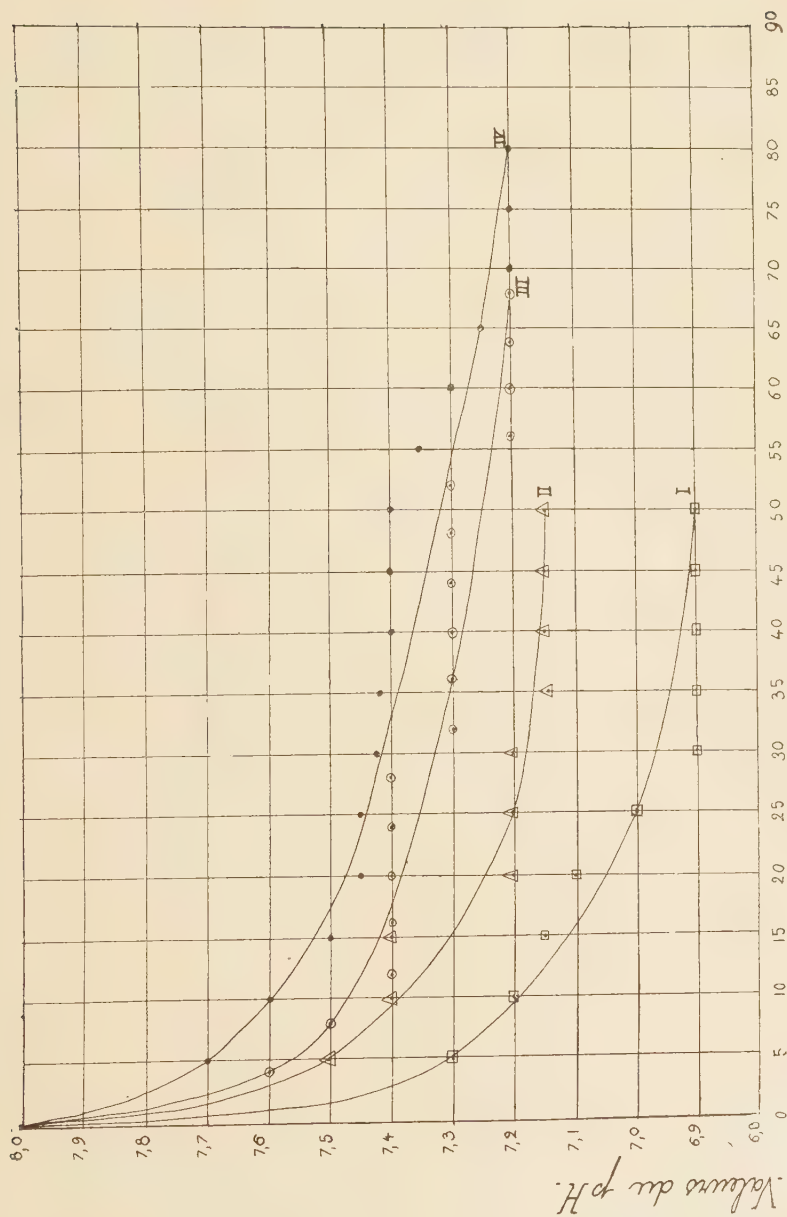


Fig. XVII

Action de 1 cc. de pancréatine de concentration décroissante sur 10 cc. d'une solution de gélatine à 5 % (I à IV).

Après atteinte de l'équilibre et rétablissement du pH à sa valeur optimale de 8, dans un certain nombre de tubes nous réalisions une dissolution des produits formés par addition de quantités variables d'eau, tandis que dans les autres, nous concentrions ces produits par addition de glyocolle, de leucine et de peptone à des concentrations différentes. De nouvelles mesures de pH étaient faites après des intervalles de temps variables.

Par addition de 2 cc. d'eau dans chaque tube, nous avons observé un nouvel abaissement du pH d'environ 0,2 au bout d'une heure, de 0,4 au bout de 10 heures ; par addition de 5 cc. d'eau, l'abaissement de pH atteignait 0,4 après 1 heure et 0,6 après 10 heures ; ceci aussi bien pour la gélatine que pour la caséine.

Par contre, par addition de glyocolle, de leucine et de peptone après atteinte de l'équilibre et rétablissement du pH initial 8, nous n'avons observé aucune nouvelle variation de pH dans les heures suivantes.

D'autre part, l'addition de ces mêmes corps, à des moments variables de la phase initiale nous a montré une action paralysante nette du glyocolle et de la leucine (l'abaissement-limite n'étant atteint qu'après 120 à 150 minutes, et même 200 minutes si l'addition était faite au début), tandis que l'addition de peptone ne diminuait que légèrement la vitesse.

De ces faits, il semble résulter que les produits ultimes de la réaction exercent une action paralysante nette, tandis que les produits intermédiaires : peptones, n'auraient qu'une action retardatrice assez faible.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU FERMENT.

Pour étudier l'influence de la concentration du ferment, nous avons fait agir des solutions de pancréatine de concentration croissante sur une solution de gélatine de concentration constante. Les graphiques XVII et XVIII représentent les variations de pH observées en faisant agir des solutions de pancréatine à 1/10000 (courbe I), 1/20000 (courbe II, 1/50000 (courbe III) et 1/60000 (courbe IV) sur la gélatine à 5 %, les pH initiaux étant respectivement de 8 et 8,4.

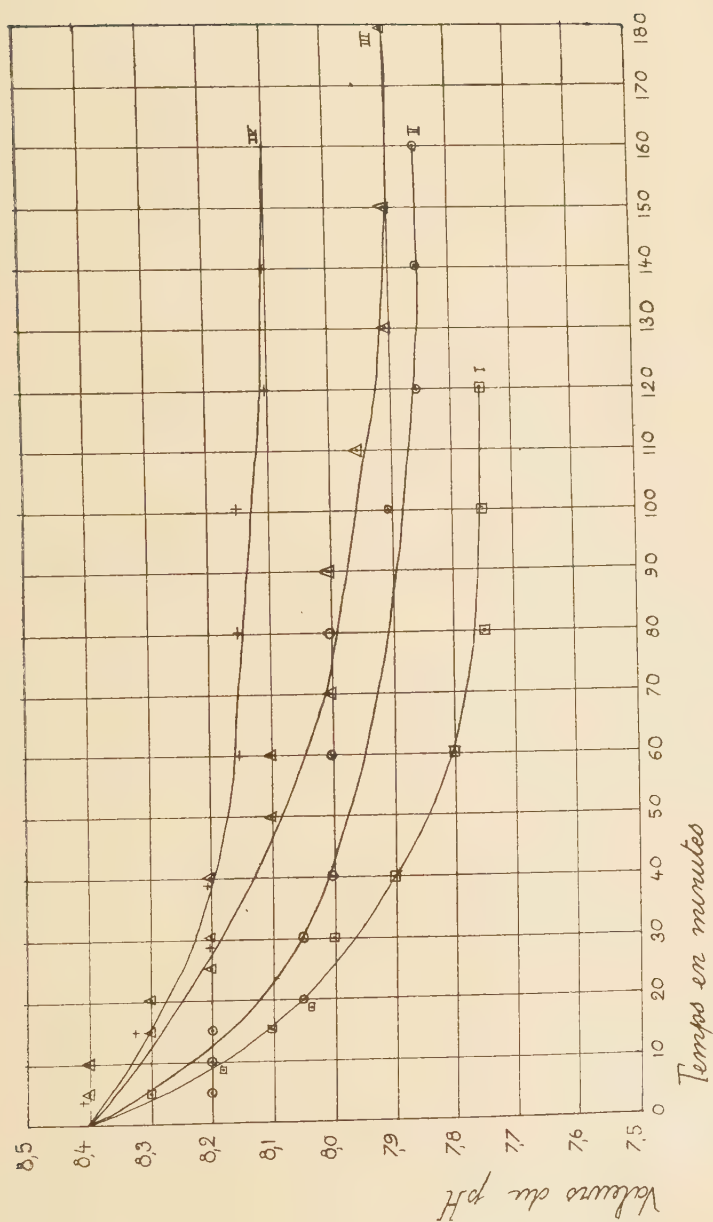


FIG. XVIII

Action de 1 cc. de pancréatine de concentration décroissante sur 10 cc. d'une solution de gélatine à 5 % (I à IV).

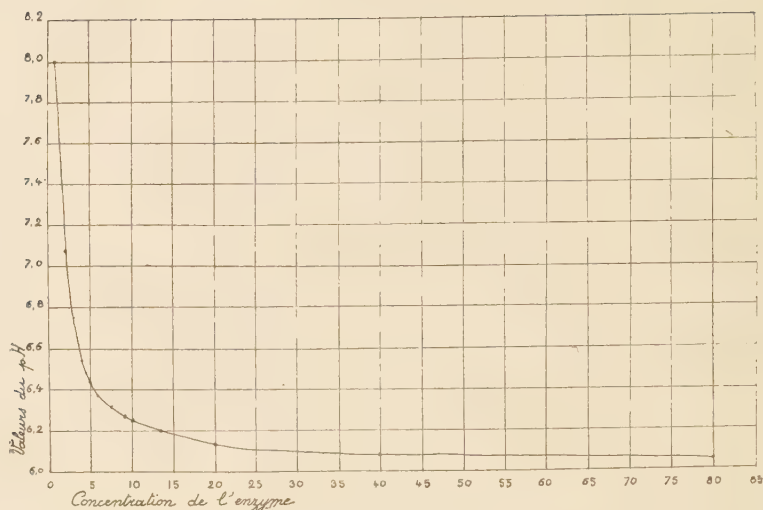


FIG. XIX

On voit que le processus est d'autant plus rapide que la concentration du ferment est plus grande et que la dissociation est plus profonde.

Comme pour l'amylase, nous avons étudié d'autre part l'activité spécifique du ferment, c'est-à-dire l'abaissement de pH déterminé par l'unité de quantité de ferment.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous, et la courbe XIX représente la courbe d'activité du ferment en fonction de sa concentration relative.

Quantité relative de trypsine C	Temps mis pour produire le même effet T	Vitesse moyenne V	Activité spécifique $A = \frac{V}{C}$
1,00	50,00	20,00	20,00
2,00	46,15	21,60	10,80
4,00	46,15	21,60	5,40
4,44	46,15	21,60	4,87
5,00	46,15	21,60	4,32
5,71	46,15	21,60	3,78
6,66	46,15	21,60	3,24
8,00	42,85	23,30	2,90
10,00	40,00	25,00	2,50
13,33	37,50	26,60	2,00
20,00	37,50	26,60	1,33
40,00	33,33	30,00	0,75
80,00	30,00	33,33	0,42

On voit, dans ce cas encore, que si des quantités plus grandes de ferment produisent un abaissement de pH plus rapide et plus important que de petites quantités, par contre, l'activité spécifique pour le ferment concentré est plus petite que pour le ferment dilué.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT

Nous avons étudié l'influence de la concentration du substrat en faisant agir une solution de pancréatine de concentration constante à 1/10000 sur des solutions de gélatine thymolée de concentration croissante. Les variations du pH ont été mesurées après des intervalles de temps de 30 et de 60 minutes.

Le tableau ci-dessous et le graphique XX représentent ces variations en fonction de la quantité de substrat.

Concentration du substrat %	pH après 30 min	pH après 60 min.
0,1	7,9	7,8
0,2	7,9	7,8
0,3	7,9	7,8
0,4	7,9	7,7
0,5	7,8	7,7
0,6	7,8	7,7
0,7	7,8	7,65
0,8	7,75	7,65
0,9	7,7	7,6
1,0	7,65	7,55
1,5	7,6	7,55
2,0	7,5	7,4
2,5	7,5	7,3
3,0	7,45	7,3
3,5	7,45	7,25
4,0	7,45	7,25
4,5	7,4	7,2
5,0	7,4	7,2
6,0	7,3	7,2
7,0	7,35	7,25
8,0	7,45	7,3
9,0	7,6	7,5
10,0	7,65	7,55

De ce tableau, il résulte que si la concentration du substrat augmente, le pH varie en sens contraire et décroît ; son abaissement augmente jusqu'à une valeur maximale correspondant au pH 7,3 après 30 min., 7,2 après 60 minutes ; au delà de cette valeur, pH et concentration varient dans le même sens ; mais l'abaissement du pH décroît, tandis que la concentration du ferment augmente. Il semble donc qu'il y ait une concentration optimale du substrat pour une concentration donnée du ferment : elle serait de 4,5 à 6 % pour la gélatine dissociée par une solution de pancréatine au 1/10000.

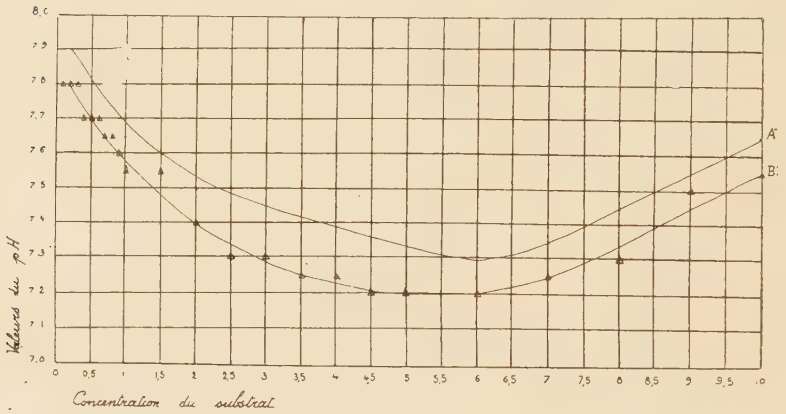


FIG. XX

CHAPITRE III

ÉTUDE DE LA LIPASE

Par suite des notions récemment acquises sur les lipides le cadre des lipases proprement dites s'est considérablement élargi. Il comprend actuellement, outre les ferments des glycérides ou éthers de la glycérine, les ferments qui dissocient les éthers gras supérieurs et les éthers de la cholestérine ; enfin, il convient d'y ajouter les ferments mal connus qui dissocient les éthers de la lécithine et des autres phosphatides, la phosphatase, la chlorophyllase, la tannase et les sulfatases.

Nous avons utilisé, dans nos expériences, la lipase pancréatique préparée par extractions à la glycérine et lavages répétés à l'acétone, centrifugation et dilution dans l'eau. Le ferment était mis en solution dans la glycérine.

Nous avons fait agir ce ferment sur divers substrats additionnés de 6 mmg. de chlorure de calcium, activateur, et amenés au pH optimal de 8 par adonction de la solution-tampon ammoniacque-chlorure d'ammonium.

Toutes les expériences ont été effectuées à la température optimale de 40°.

Willstätter a particulièrement insisté sur le rôle des activateurs spécifiques de la lipase pancréatique, comme l'indique le tableau suivant établi par Willstätter et Memmen:

DIMINUTION DU NOMBRE DE GOUTTES AU STALAGMOMÈTRE
A 20°

Temps min.	GLYCOCOLLATE DE NA		LEUCYLGLYCYLGLYC.		OLÉATE DE CALCIUM	
	sans addit.	0,1 mmg. Ca Cl ²	sans addit.	30 mmg. Ca Cl ²	sans addit.	0,13 mmg. Ca Cl ² + 0,063 oléate de Na
10	2,5	6,5	9	29,5	1	5,5
20	5	13,5	—	—	1,5	9
30	11	26	—	—	4	15
40	16	29	—	—	6	19

De ce tableau, il résulte que si la concentration du substrat augmente, le pH varie en sens contraire et décroît ; son abaissement augmente jusqu'à une valeur maximale correspondant au pH 7,3 après 30 min., 7,2 après 60 minutes ; au delà de cette valeur, pH et concentration varient dans le même sens ; mais l'abaissement du pH décroît, tandis que la concentration du ferment augmente. Il semble donc qu'il y ait une concentration optimale du substrat pour une concentration donnée du ferment : elle serait de 4,5 à 6 % pour la gélatine dissociée par une solution de pancréatine au 1/10000.

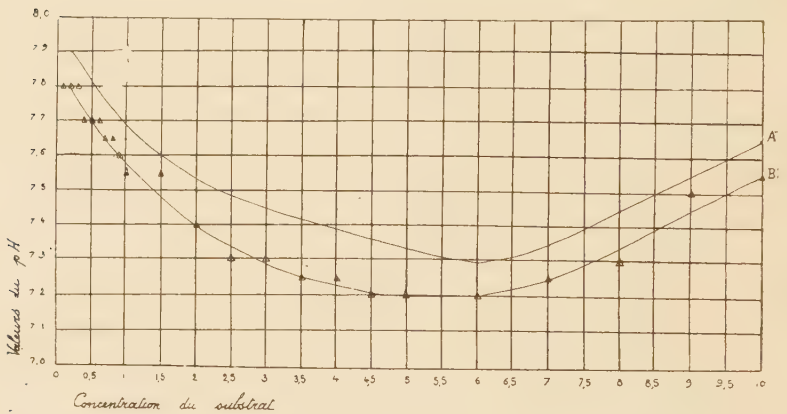


FIG. XX

CHAPITRE III

ÉTUDE DE LA LIPASE

Par suite des notions récemment acquises sur les lipides le cadre des lipases proprement dites s'est considérablement élargi. Il comprend actuellement, outre les ferments des glycérides ou éthers de la glycérine, les ferments qui dissocient les éthers gras supérieurs et les éthers de la cholestérine; enfin, il convient d'y ajouter les ferments mal connus qui dissocient les éthers de la lécithine et des autres phosphatides, la phosphatase, la chlorophyllase, la tannase et les sulfatases.

Nous avons utilisé, dans nos expériences, la lipase pancréatique préparée par extractions à la glycérine et lavages répétés à l'acétone, centrifugation et dilution dans l'eau. Le ferment était mis en solution dans la glycérine.

Nous avons fait agir ce ferment sur divers substrats additionnés de 6 mmg. de chlorure de calcium, activateur, et amenés au pH optimal de 8 par addition de la solution-tampon ammoniacque-chlorure d'ammonium.

Toutes les expériences ont été effectuées à la température optimale de 40°.

Willstätter a particulièrement insisté sur le rôle des activateurs spécifiques de la lipase pancréatique, comme l'indique le tableau suivant établi par Willstätter et Memmen:

DIMINUTION DU NOMBRE DE GOUTTES AU STALAGMOMÈTRE
A 20°

Temps min.	GLYCOCOLLATE DE NA		LEUCYLGLYCYLGLYC.		OLÉATE DE CALCIUM	
	sans addit.	0,1 mmg. Ca Cl ²	sans addit.	30 mmg. Ca Cl ²	sans addit.	0,13 mmg. Ca Cl ² + 0,063 oléate de Na
10	2,5	6,5	9	29,5	1	5,5
20	5	13,5	—	—	1,5	9
30	11	26	—	—	4	15
40	16	29	—	—	6	19

D'après Willstätter, l'intervention des sels de Ca aurait pour but d'éliminer des savons de chaux qui adsorbent ferment et substrat. Il se formerait alors une « adsorption couplée » du type suivant :



favorisant l'activation du ferment.

Pour apprécier l'activité du ferment, nous avons mesuré l'abaissement de tension superficielle du liquide (méthode utilisée par Rona, Willstätter), au moyen du compte-gouttes de Duclaux, en observant la diminution du nombre des gouttes fournies à la température de 20° si l'on fait varier la durée d'action du ferment ou la nature du substrat.

FAITS OBSERVÉS

1° ETUDE COMPARATIVE DE DIVERS SUBSTRATS.

L'étude de l'action de la lipase pancréatique sur des substrats de nature différente nous a montré que les rapports des vitesses d'attaque des différents substrats à la vitesse d'hydrolyse de l'acétate d'éthyle AE, étaient représentés de la façon suivante :

Butyrate d'éthyle.....	0,99
Palmitate d'éthyle.....	0,95
Stéarate d'éthyle.....	0,92
Oléate d'éthyle.....	0,90
Huile d'olive	0,83

La faculté de dissociation de la lipase pancréatique est donc plus grande pour les éthers d'acides gras inférieurs que pour les éthers d'acides gras supérieurs.

Si l'on s'adresse à des triglycérides, l'expérience montre

que le pouvoir fermentatif augmente pour la tributyrine, puis diminue pour les triglycérides supérieurs :

<i>Tributyrine</i>	1,5
<i>Triacétine</i>	1,2
<i>Tripalmitine</i>	0,95
<i>Tristéarine</i>	0,89
<i>Trioléine</i>	0,85
Huile d'olive.....	0,82

2° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU FERMENT

La quantité de substrat : huile d'olive, restant constante (2 g.), nous avons fait varier la concentration du ferment. Le tableau ci-dessous résume les résultats observés :

<i>Quantité relative de lipase C</i>	<i>Temps mis pour produire le même effet T</i>	<i>Vitesse moyenne V</i>	<i>Activité spécifique $\frac{V}{C}$</i>
1,00	82	12	12
2,00	55	18	9
4,00	40	25	6,25
5,00	33	30	6
6,00	33	30	5
8,00	33	30	3,75
10,00	33	30	3

On voit que la vitesse du phénomène croît jusqu'à un maximum à partir duquel elle reste constante ; au contraire, l'activité spécifique du ferment décroît progressivement à mesure que sa concentration augmente.

CONCLUSIONS

L'étude de quelques ferments animaux, amylase, trypsine et lipase, nous a montré les faits suivants :

I. — L'amylase, même dépourvue d'électrolytes, peut attaquer l'amylose exempte de sels.

Mais la courbe représentant la vitesse d'hydrolyse, en fonction du temps, à la température de 37,5° et au pH de 6,7 n'est pas une courbe simple. Elle présente deux maximums : l'un, le « maximum absolu », fixe, se produisant au début de la réaction, l'autre, le « maximum relatif », variable, survenant au milieu de la réaction, et un minimum peu variable, indiquant un ralentissement du processus. Il ne semble pas y avoir de relation entre la valeur et la position de ces maximums d'une part, et la concentration en ferment et en substrat d'autre part.

L'addition d'une faible quantité de NaCl dilué produit une diminution du ralentissement initial, disparaissant complètement par l'addition simultanée d'acides aminés.

L'amylase dépourvue d'électrolytes se comporte donc différemment du ferment activé et sa vitesse d'action suit une loi complexe.

L'activité d'un ferment diminue quand sa concentration augmente.

De plus, l'étude des variations parallèles de la vitesse du phénomène et du pouvoir fermentatif $Af = \frac{K. \text{ g. substrat}}{\text{g. ferment}}$ et du rapport des concentrations du substrat et du ferment montre que ces trois facteurs croissent dans le même sens, c'est-à-dire que, pour des solutions diluées d'amylase, la vitesse et le pouvoir du ferment augmentent quand la concentration relative du substrat augmente par rapport à celle du ferment.

II. — L'étude de la digestion tryptique par la mesure des variations de réaction du milieu (mesure des abaisséments de pH) montre une diminution progressive de la vitesse d'hydrolyse au cours du processus, auquel ne s'applique pas la loi monomoléculaire.

La vitesse d'attaque par la pancréatine est plus grande pour la gélatine que pour la caséine.

La caséine, en solution dans la soude N/20 ou le fluorure de sodium à 1 % est plus rapidement hydrolysée que la caséine en solution aqueuse.

L'optimum de réaction, très limité, correspond à un pH de 8. Les variations de pH au cours de la réaction ne semblent pas influencer la vitesse du phénomène, tout au moins dans les cas de digestion rapide.

En ce qui concerne l'influence des produits de la réaction, leur dilution entraîne une reprise du processus ; leur concentration par l'addition d'acides aminés : glycocole et leucine, à des instants variables de la première phase, le ralentit notablement, l'addition de peptone n'ayant qu'une faible influence.

Pour une même quantité de substrat, l'activité du ferment diminue quand sa concentration augmente.

Pour une même concentration du ferment (1/10000^e), il y a une concentration optimale du substrat (5,5 à 6,5 %) pour laquelle l'abaissement de pH est maximum.

III. — L'étude de la lipase nous a montré que son action, s'exerçant à la fois sur les éthers d'acides gras inférieurs et supérieurs, était cependant plus marquée pour les premiers.

Quand la concentration en ferment croît, la vitesse augmente jusqu'à un certain maximum, puis reste constante

Le rapport des concentrations du substrat au ferment étant relativement faible, l'activité de la lipase augmente proportionnellement à la concentration du substrat jusqu'à une valeur maximale à partir de laquelle elle diminue si le substrat est de plus en plus concentré.

L'étude de l'influence de certains sels montre que, tandis

que les sels de calcium sont nettement activants, le fluorure de sodium paralyse la réaction et le chlorure de sodium n'a aucune action sur le processus.

L'alcool ralentit la réaction.

La glycérine à faible concentration n'a aucune action ; à haute dose, elle accélère le processus.

VU : *Le Doyen,*
H. ROGER.

VU : *Le Président de Thèse,*
H. ROGER.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Pour le Recteur de l'Académie de Paris,
L'Inspecteur de l'Académie,
MAURELLET.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDERHALDEN (E.) : *Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden*, 2 Aufl. 1923.
- ABDERHALDEN (E.) : *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 5 Aufl., Berlin, 1923.
- ABELOUS (J. E.) et BIARNÈS : Sur l'existence d'une oxydase chez les Crustacés. *Arch. de Physiol.*, 277, 1897.
- ABELOUS (J.-E.) et GÉRARD : Sur la coexistence d'une diastase réductrice et d'une diastase oxydante dans les organes animaux. *C. R. Ac. Sc.*, **129**, 1023, 1899.
- ABELOUS (J.-E.) : Quelques conditions de l'activité d'un ferment oxydant. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 891, 1903.
- ABELOUS (J.-E.) : Présence dans l'organisme animal d'une diastase à la fois oxydante et réductrice. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 1535, 1903.
- ABELOUS (J.-E.) et ALOY : Hydrolyses digestives par ionisation mécanique de l'eau. *C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1012, 1920.
- AMBARD (L.) : Fixation de l'amylase sur l'amidon cru et l'empois d'amidon. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1458, 1920.
- AMBARD (L.), PELBOIS et M^{lle} BRICKA : Similitude de l'hydrolyse du sucre par les acides et de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase. Etude du mécanisme de certaines réactions monomoléculaires. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **2**, 42, 1920.
- APERT : Conceptions nouvelles sur les actions diastasiques. *Le Nourisson*, mai 1914.
- ARMSTRONG (E. F.) : Studies on Enzyme Action. *Proc. Roy. Soc.*, **73**, 500^r 1904.
- ARMSTRONG (E. F.) : Enzymes. *Chem. World*, 117, 1913.
- ARMSTRONG, (H. E.) and E. F. ARMSTRONG : The Nature of Enzymes. *Proc. Roy. Soc.*, **79**, 365, 1907.
- ARMSTRONG, (E. F.) : and T. P. HILDITCH : A Study of catalytic Actions at solid Surfaces. *Proc. Roy. Soc.*, **96**, 137, 1920.
- ARTHUS (M.) : *Nature des enzymes*. Thèse Paris, 1896.
- BACH (A.) : Sur une méthode applicable à la détermination du point isoélectrique des amino-acides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 1233, 1927.
- BACH (A.) et CHODAT : Recherches sur les ferments oxydants. *Arch. des Sc. phys. et nat.* Geneva, **37**, 477, 1903.
- BACH (A.) et BATELLI : Oxydations et dédoublements dans l'organisme animal. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 732, 1903.
- BANCROFT, WILDER (D.) : *Applied colloid Chemistry*. London, 1921.
- BATELLI (F.) et STERN : II. Die Oxydationsfermente. *Ergebn.*, **12**, 96, 1912.
- BAYLISS (W.-M.) : The Kinetics of Tryptic Action. *Arch. des Sc. Biol.*, **11**, 261, 1904.
- BAYLISS (W.-M.) : Researches on the Nature of Enzyme Action. I. On the Causes of the Rise in electrical Conductivity under the Action of Trypsin. *Journal Physiol.*, **36**, 221, 1907.
- BAYLISS (W. M.) : *Principles of General Physiology*. London, 1924.
- BAYLISS (W. M.) : *The Nature of Enzyme Action*. London, 1925.
- BAYLISS (W. M.) and STARLING (E. H.) : On the Relation of Enterokinase to Trypsin. *Journ. Physiol.*, **32**, 129, 1905.
- BERNARD (Cl.) : *Leçons de Physiologie expérimentale*. Paris, 1855-1856.

- BERNARD (Cl.) : *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. Paris, 1878-1879.
- BERTHELOT et PÉAN DE SAINT-GILLES : Recherches sur les affinités. De la formation et de la décomposition des éthers. *Ann. de Chim. et de Phys.*, **65**, 385, 1862.
- BERTRAND (G.) : Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquées par la laccase. *C. R. Ac. Sc.*, 124, 1032, 1897.
- BERTRAND (G.) : Sur l'action oxydante des sels manganoux et sur la constitution chimique des oxydases. *C. R. Ac. Sc.*, **125**, 1355, 1897.
- BERTRAND (G.) et P. THOMAS : *Guide pour les manipulations de chimie biologique*. Paris, 1910.
- BERTRAND (G.) et ROSENBLATT : Sur la température mortelle des tyrosinases végétales. *C. R. Ac. Sc.*, **150**, 1142, 1910.
- BERTRAND (G.) et A. COMPTON : Influence de la température sur l'activité de la salicinase. *Bull. Soc. Chim.*, 294, 1921.
- BIERRY (H.) : *Recherches sur les diastases qui concourent à la digestion des hydrates de carbone*. Thèse Sciences, Paris, 1911.
- BIERRY (H.) Du rôle des électrolytes dans les actions diastasiques. *Journ. Physiol. et Pathog. gén.*, **40**, 250, 1912.
- BIERRY (H.) : Amylasè pancréatique et ion Cl. *C. R. Soc. Biol.*, **77**, 1111, 1922.
- BIERRY (H.), GIAJA et V. HENRI : Inactivité amylolytique du suc pancréatique dialysé. *C. R. Soc. Biol.*, **60**, 479, 1906.
- BINET (L.) : *Physiologie du nouveau-né et du nourrisson*. In : Roger, H., et L. Binet : *Traité de Physiologie normale et pathologique*. **11**. Paris, Masson, 1927.
- BLANCHETIÈRE (A.) : L'évolution de nos connaissances sur la structure chimique des matières protéiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **7**, 218, 1925.
- BOURQUELOT (E.) : Recherches relatives à l'action des sucs digestifs des Céphalopodes sur les matières amylacées. *C. R. Ac. Sc.*, **93**, 978, 1881.
- BOURQUELOT (E.) : Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les Mollusques céphalopodes. *Arch. zool., exp.*, II, série **3**, 385, 1882.
- BOURQUELOT (E.) et M. BRIDEL : Synthèse des glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine et réversibilité des actions fermentaires. *Ann. de Chim. et phys.*, **28**, 145, 1913.
- BRIDEL (M.) La synthèse biochimique des hexobioses. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **4**, 329, 1922.
- BRIDEL (M.) : Réflexions sur les diastases et leur spécificité. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **8**, 170, 1926.
- BROWN (A. J.) : The velocity of Starch Hydrolysis by Diastase with some Remarks on Enzyme-Action. *Trans. Chem. Soc.*, **81**, 388, 1902.
- BUCHNER (E.), H. BUCHNER und M. HAHN : *Die Zymasegärung*. München, 1903.
- CALMETTE (A.) : L. NEGRE et A. BOQUET : *Manuel technique de microbiologie et sérologie*. Masson, 1925.
- CAMUS (J.) et GLEY (E.) : Influence des macérations de l'intestin sur l'action protéolytique du suc pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **54**, 434, 1902.
- CANALS : Recherches chimiques sur la sucrase. *Bull. Soc. Chim.*, **31**, 921, 1922.
- CHAUDUN (A.) : *Recherches physico-chimiques sur l'inversion diastasique du saccharose*. Thèse Paris, 1920.
- CHRZASZEY : Einfluss der Temperatur auf die Wirkung der Amylase. *Bioch. Zeitschr.*, **142**, 417, 1923.
- COLE (S. W.) : The Influence of Electrolytes on the Action of Amylolytic Ferments. *Journ. Physiol.*, **30**, 202, 1904.
- COLIN (H.) : Quelques corollaires des lois de l'hydrolyse diastasique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **3**, 263, 1921.

- COLIN (H.) et A. CHAUDUN : Loi d'action de la sucrase ; viscosité et vitesse de réaction. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **4**, 273, 1922.
- COLIN (H.) et A. CHAUDUN : Vitesse d'hydrolyse et concentration en ions H. *C. R. Ac. Sc.*, **186**, 142, 1928.
- COMPTON (A.) : Studies on the Mécanism of Enzyme Action. I. Role of the Reaction of the Medium in fixing the optimum Temperature of a Ferment. *Proc. Roy. Soc.*, **92**, 1920.
- COUTIÈRE (H.) : Echanges d'ions et surfaces. *Biol. Méd.*, **17**, 441, 1927.
- DASTRE (A.) : Facteurs de la digestion tryptique. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 322, 1903.
- DEJUST : Pigments mélaniques et ferments de la peau humaine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 1165, 1927.
- DELEZENNE (C.) : Activation du suc pancréatique par les sels de Ca. *C. R. Soc. Biol.*, **59**, 476, 1905.
- DÉROME : Contribution à l'étude du passage dans l'urine de quelques ferments digestifs. Paris, 1896.
- DOUMER (E.) : Conservation de l'amylase salivaire par la glycérine. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 678, 1922.
- DRAGANESCO (St.) et Al. DRAGANESCO : Quelques recherches sur les ferments des tissus chez le pigeon normal en avitaminose. *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 1470, 1925.
- DUBOIS (R.) et POLONOWSKI : Sur la concentration en ions H du suc pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 632, 1925.
- DUBRUNFAUT : Ueber Verwandlung des Stärkemehls in Zucker durch Malz. *Bull. des Sc. Technolog.* Paris, 1830.
- DUCLAUX (E.) : Sur l'action des diastases. *Ann. Inst. Pasteur*, **10**, 96, 1898.
- DUCLAUX (E.) : *Traité de microbiologie*. Masson, 1898-1900.
- DUCLAUX (J.) : *Les Colloïdes*. Paris, 1922.
- DUTCHER : Vitamine Studies. I. Observations on the catalase Activity of Tissues in avian polyneuritis. *Journ. Biol. Chem.*, **36**, 72, 1918.
- EFFRONT (J.) : *Les enzymes et leurs applications*. Paris, 1899.
- EFFRONT (J.) : Sur un nouvel enzyme hydrolytique, la caroubinase. *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1897.
- EFFRONT (J.) : Influence de la filtration sur les amylases. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 271, 1922.
- EFFRONT (J.) : Absorption de la pepsine par les papiers à filtrer. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1058, 1922.
- EULER (H. v.) : Allgemeine Chemie der Enzyme. *Ergebn. der Physiol.*, **6**, 187, 1907.
- EULER (H. v.) : Zur Nomenclatur der Enzyme. *Zeitsch für physiol. chemie*, **74**, 13, 1911.
- EULER (H. v.) : *Chemie der Enzyme*. 3. Aufl. München, 1922-1927.
- EULER (H. v.) et LAURIN : Sur les coefficients de température de l'action de la saccharase. *Zeitschr für Physiol. Chem.*, **110**, 55, 1920.
- EULER (H. v.) et SVANBERG : Ueber die Regeneration inaktivierter Saccharase durch Dialyse. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, **119**, 137, 1921.
- FABRE (J.-H.) : *Souvenirs Entomologiques*. Paris.
- FALK (K. G.) : *The Chemistry of Enzyme actions*. New-York, 1910.
- FAIKENHAUSEN (M. v.) et HANS F. FUCHS : Ueber proteolytische Fermente im Serum. *Bioch. Zeitschr.*, **181**, 438, 1927.
- FAIKENHAUSEN (M. v.) : Ueber proteolytische Fermente im Serum. VIII. Untersuchungen über die Möglichkeit einer Grundeinheit der Bluttermente. *Bioch. Zeitschr.*, **180**, 334, 1927.
- FANNER et REDENBAUGH : The decrease in digestive Efficiency in polyneuritis Columbarum. *Am. Journ. of Physiol.*, **175**, 45, 1921.

- FERNBACH (H.) : *Recherches sur la sucrase, diastase inverse du sucre de canne.* Thèse, Paris, 1890.
- FISCHER (E.) : Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, **27**, 2985, 1894 et **28**, 1429, 1895.
- FISCHER (E.) und P. LINDNER : Ueber die Enzyme von Schizosaccharomyces octosporus und S. Marxianus. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, **28**, 984, 1895.
- FISCHER (E.) und E. F. ARMSTRONG : Synthèse einiger neuer Disaccharide. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, **35**, 3144, 1902.
- FLEURY (P.) : Lois d'action de la laccase. *C. R. Ac. Sc.*, **79**, 709, 1924.
- FLEURY (P.) : L'action toxique de la cyanhydrine sur la laccase et sa relation avec la réaction du milieu. *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 596, 1925.
- FLEURY (P.) : La laccase et les lois d'action des diastases. *Journ. Pharm. et Chim.*, 105, 1925.
- FODOR (A.) : *Das Fermentproblem.* Dresden, 1922.
- FONSECA (H. da) : Influence de quelques sels minéraux sur l'action amylolytique de la pancréatine. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1033, 1922.
- FONSECA (H. da) : Action des divers ions sur l'amylase pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 313, 1923.
- FREDERICQ (L.) : Sur la digestion des albuminoïdes chez quelques Invertébrés. *Bull. Ac. Roy. Belg.*, **47**, 1878.
- FROSSARD : *La papaïne.* Thèse Paris, 1925.
- FROUIN et COMPTON : Inactivation de la trypsine par dialyse vis-à-vis de l'eau distillée, réactivation de cette diastase par addition de sels. *C. R. Ac. Sc.*, **153**, 1032, 1911.
- GERBER (C) : Coagulation du lait. *C. R. Soc. Biol.*, 1907-1910.
- GESSARD : Tyrosinase. *C. R. Soc. Biol.*, **54**, 551, 1902 ; **54**, 1304, 1902 et **71**, 591, 1911.
- GESSARD : Préparation des diastases. *C. R. Soc. Biol.*, **66**, 913, 1909.
- GIAJA : Ferments des glucosides et des H. de C. chez les crustacés marins. *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 508, 1907.
- GIAJA : Influence des produits de dédoublement de l'amygdaline sur le rapport dans lequel ceux-ci apparaissent au cours de l'hydrolyse diastasique de ce glucoside. *C. R. Soc. Biol.*, **75**, 33, 1913.
- GIRARD (P.) : A propos du mécanisme de l'action des diastases protéolytiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1**, 1926.
- GRASSMANN (W.) : Neue Methoden und Ergebnisse der Enzymforschung. *Ergebn. d. Physiol.*, **27**, 407, 1928.
- GROLL (J.) TEMMINCK : L'influence des facteurs physiques et chimiques sur l'action des ferments. II. Actions complexes. *Arch. Néerl. de Physiol.*, **4**, 382, 1920.
- GRUZEWSKA (M^{me}), A. MAYER et G. SCHAEFFER : Sur la structure ultra-microscopique des empois d'amidon et de leurs constituants. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 599, 1908.
- GUIGNARD (L.) : Recherches sur la localisation du principe actif des Crucifères. *Journ. de Bot.*, 1890.
- GUILLEMOT (H.) : *Les nouveaux horizons de la science.* Paris, Masson, 1913.
- GUYENOT : Influence de la dialyse et des sels minéraux sur l'activité du ferment amylolytique de la salive. *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 768, 1907.
- HANRIOT (M.) : Sur un nouveau ferment du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 753, 1896.
- HANRIOT (M.) : Sur la réversibilité des actions diastasiques. *C. R. Soc. Biol.* **53**, 70, 1901 et **132**, 212, 1901.
- HANRIOT (M.) : Influence de la température sur les ferments. *C. R. Soc. Biol.*, **53**, 67, 1901.

- HARLAY : Caractères différentiels des produits de la digestion pepsique et de la digestion pancréatique de la fibrine. *C. R. Soc. Biol.*, **51**, 70, 1899.
- HÉDON (L.) : Démonstration par tests colorés de l'action protéolytique du suc pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 171, 1923.
- HÉDON (L.) : III. Sur le changement de réaction du milieu et l'abaissement du pH pendant la digestion in vitro des protéiques par le suc pancréatique. *Journ. Physiol. et Patho. gen.*, **21**, p. 295, 1923.
- HENRI (V.) : *Lois générales de l'action des diastases*. Thèse Paris, 1903.
- HENRI (V.) : Ferments digestifs chez quelques Invertébrés. *C. R. Soc. Biol.* **55**, 1316, 1903.
- HENRI (V.) : Considérations théoriques relatives aux lois générales des diastases. *C. R. Soc. Biol.*, **57**, 773, 1904, et **58**, 826, 1905.
- HENRI (V.) et PHILOCHE : Action des diastases. *C. R. Soc. Biol.*, **61**, 734, 1906.
- HÉRISSEY (H.) : Recherches chimiques et physiologiques sur la digestion des mannanes et des galactanes. *Rev. gén. Bot.*, **15**, 1903.
- HILL (A.) CROFT : The Reversibility of Enzyme or Ferment Action. *Trans. Chem. Soc.* **83**, 578, 1903.
- HOPKINS (F. G.) and M. DIXON : On glutathione. II A thermostable Oxydation. — Réduction System. *Journ. Biol. Chem.*, **54**, 527, 1922.
- HUGOUNENCO et LOISELEUR : Sur la superposition des phénomènes de dissociation et d'absorption élective dans les diastases protéolytiques. *C. R. Ac. Sc.*, **181**, 149, 192.
- JACOBY (M.) : Ueber künstliche Zymogène. *Bioch. Zeits.*, **104**, 316, 1920.
- JAVILLIER (M.) : *Contribution à l'étude de la présure chez les Végétaux*. Thèse Paris, 1903.
- JAVILLIER (M.) : *Les ferments protéolytiques*. Paris, 1909.
- JONGE (J.-A. de) : L'activation de la lipase pancréatique par les cholates. *Arch. Néerl. de Physiol.*, **1**, 182, 1915.
- KLUG (F.) : Pourquoi les ferments protéolytiques ne digèrent-ils pas l'estomac et l'intestin sur le vivant ? *Arch. Intern. de Physiol.*, **5**, 297, 1907.
- KOLTHOFF (J.) : *Der Gebrauch der Farbenindikatoren*, 2 Aufl. 1922.
- KOPACZEWSKI (W.) : *Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine*. Paris, 1923.
- KUGELMASS : Action de la température sur la vitesse de coagulation du sang. *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 996, 1921.
- LAER (H. van) : Nouvelles recherches sur la vitesse de saccharification de l'amidon. — *Bull. Ac. Roy. Belg.*, 362, 1911.
- LAUNOY (L.) : Technique pour suivre la marche de la protéolyse dans un milieu gélatine-trypsine. *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 742, 1918.
- LE DANTEC : Recherches sur la digestion intracellulaire chez les Protozoaires. *Ann. Inst. Pasteur*, **4**, 276, 1890 et **5**, 163, 1891.
- LEGENDRE (R.) : *La concentration des ions hydrogène de l'eau de mer. Le pH*. Paris, 1925.
- LESNÉ (E.) et L. BINET : *Physiologie normale et pathologique du Nourrisson*. Paris, 1921.
- LIEBIG : Sur les phénomènes de la fermentation et de la putréfaction et sur les causes qui les provoquent. *Ann. Chim. et Phys.*, **71**, 147, 1839.
- LISBONNE (M.) : Conditions de milieu nécessaires à l'action de l'amylase salivaire. *C. R. Soc. Biol.*, **70**, 62, 1911.
- LISBONNE (M.) et VULQUIN : Inactivation de l'amylase du malt par la dialyse électrique. *C. R. Soc. Biol.*, **72**, 936, 1912.
- LOEB (J.) : *La dynamique des phénomènes de la vie*. Paris, 1908.
- LOEB (J.) : *La théorie des phénomènes colloïdaux*. Paris, 1925.
- LOEB (J.) : *Les Protéines* (traduction Mouton). Paris, 1924.

- LOEPER (M.) et M.-E. BINET : Ferment amylolytique du foie. *C. R. Soc. Biol.*, **66**, 635, 1909.
- LOEPER (M.) et ESMOND : Foie et Ferments digestifs. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 585 1908.
- LOEPER (M.) et FICAÏ : Ferments du rein. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 1033, 1907.
- LOEPER (M.) et FICAÏ : Origine pancréatique de l'amylase sanguine. *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 266, 1907.
- LOEPER (M.), DEBRAY et TOUNET : Présence d'un ferment peptique dans le liquide céphalorachidien. *C. R. Soc. Biol.*, **84**, 968, 1921.
- MAIGE (A.) : Amylogénèse et amyolyse dans les cellules végétales. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 1108, 1927.
- MAQUENNE (L.) et ROUX : Recherches sur l'amidon et sa saccharification diastatique. *Ann. Chim. et Phys.*, **8**, 9, 1906.
- MESNIL et MOUTON : Diastase protéolytique extraite des infusoires ciliés. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 1016, 1903.
- MICHAELIS (L.) : Elektrische Ueberführung von Fermenten. II. Trypsin und Pepsin. *Bioch. Zeits.*, **16**, 486, 1909.
- MICHAELIS (L.) : *Manuel de techniques de Physico-chimie* (traduction Chabanier et Lobo-Onell). Paris, Masson, 1923.
- MICHAELIS (L.) et H. DAVIDSOHN : Die Abhängigkeit der Trypsinwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration. *Bioch. zeits.*, **36**, 280, 1910.
- MICHAELIS (L.) et ROHSTEIN : Beitrag zur Theorie der Invertaswirkung. *Bioch. Zeits.*, **110**, 217, 1920.
- MOLLIARD (M.) : *Nutrition de la plante*. 4 vol. Paris, 1921-1925.
- MOREL et TERROINE : Action du suc pancréatique sur les éthers. *C. R. Soc. Biol.*, **65**, 377, 1908 ; **66**, 161, 1909 ; **67**, 36, 1910 et **70** 114, 1911.
- MORI (S.) : The kinetics of Enzyme Reaction. I. Decomposition of Urea by Urease. *Journ. of Bioch. Chem.*, **8**, 1, 1927. II. Decomposition of Casein by Trypsin. *Journ. of Bioch. Chem.*, **8**, 21, 1927.
- MOUREU (Ch.) : *Notions fondamentales de chimie organique*. Paris, 1925.
- MUSCULUS : Sur la transformation de la matière amylacée en glucose et dextrine. *Ann. Chim. et Phys.*, **9**, 203, 1860.
- NATTAN-LARRIER et FICAÏ : Recherches sur la lipase, l'amylase et le ferment protéolytique du placenta. *Journ. Physiol. et Patho. gén.*, **10**, 60, 1908.
- NELSON (J. M.) and W. C. VORSBURGH : Kinetics of Invertase Action. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 790, 1917.
- NELSON (J. M.) and LARSON : Kinetics of Invertase Action. *Journ. Biol. Chem.*, **73**, 223, 1927.
- NEUBERG und OPPENHEIMER : Zur Nomenclatur der Gärungs fermente und Oxydasen. *Bioch. Zeits*, **166**, 450, 1926.
- NICLOUX (M.) : *Contribution à l'étude de la saponification des corps gras*. Paris, 1906.
- NORTHROP (J. H.) : Does the Kinetics of Trypsin Digestion dépend on the Formation of a Compound between Enzyme and Substrat ? *Journ. of gen. Physiol.*, **4**, 487, 1922.
- NORTHROP (J. H.) : The Influence of the Substrate Concentration on the rate of Hydrolysis of Proteins by Pepsin. The Significance of the hydrogen Ion Concentration for the Digestion of Proteins by Pepsin. *Journ. of gen. Physiol.*, **2**, 595, 1920 et **3**, 211, 1920.
- NORTHROP (J. H.) : Comparative Hydrolysis of Gelatin by Pepsin, Trypsin, Acid and Alkali. *Journ. of gen. Physiol.*, **9**, 57, 1922.
- NORTHROP : The Inactivation of Trypsin. *Journ. of Gen. Physiol.*, **4**, 227, 1922 et **4**, 245, 1922.
- NORTHROP : The Kinetics of Tryptic Digestion. *Journ. of Gen. Physiol.*, **4**, 227 1922.

- O'BAILLY : Les lois de la mécanique chimique régissent-elles les réactions diastasiques ? Considérations théoriques et essais d'application. *Journ. Chim. Phys.*, **16**, 28, 1928.
- OPPENHEIMER (C.) : *Die Fermente und ihre Wirkungen*. 5. Aufl. 1925.
- OPPENHEIMER (C.) : *Lehrbuch der Enzyme*. Leipzig, 1927.
- OPPENHEIMER (C.) und PINCUSSEN : *Tabulae Biologicae*. Berlin, 1925.
- O'SULLIVAN et THOMPSON : Invertase. *Journ. of Chem. Soc.*, **57**, 834, 1890.
- PACAUT : Deux propriétés diastasiques de la salive de l'escargot. *C. R. Soc. Biol.* **59**, 29, 1905.
- PAWLOW (J. P.) : *Die Arbeit der Verdauungsdrüsen*. Wiesbaden, 1900.
- PAYEN et PERSOZ : Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels. *Ann. Chim. et Phys.*, **53**, 73, 1833.
- PHILOCHE : Recherches physico-chimiques sur l'amyrase et la maltase. *Journ. Chim. Phys.*, **6**, 212, 1908, et 6, 355, 1908.
- PLATEAU (F.) : Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les Insectes. *Mém. Acad. Roy. Belg.*, **41**, 1871.
- PLATEAU (F.) : Note sur les phénomènes de la digestion et sur la structure de l'appareil digestif chez les Phalangidés. *Bull. Ac. Roy. Belg.*, série 42, **2**, 719, 1876.
- PLATEAU (F.) : Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les Myriapodes de Belgique. *Mém. Ac. Roy. Belg.*, Série 42, 1876.
- PLATEAU (F.) : Recherches sur la structure de l'appareil digestif et sur les phénomènes de la digestion chez les Aranéides dipneumones. *Bull. Ac. Roy. Belg.*, Série 2, **144**, 129, 1877.
- PLIMMER (R. H. A.) : On the Presence of Lactase in the Intestines of Animals and on the Adaptation of the Intestine to Lactose. *Journ. of Physiol.*, **35**, 20, 1906.
- PLIMMER (R. H. A.) et J. L. ROSEDALE : Distribution of Enzyme in the alimentary Canal of the Chickens. *Bioch. Journ.*, **16**, 23, 1922.
- POICARD : *Histologie physiologique*. Paris, 1922.
- PORCHER (Ch.) : *La sécrétion lactée*, in : Roger, H. et L. Binet : *Traité de Physiologie normale et pathologique*, 11, Paris, 1927.
- PORCHER (Ch.) et TAPERNOUX : Apparition de la lactase dans l'intestin pendant la vie foetale. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 420, 1920.
- PORCHER (Ch.) et TAPERNOUX : Apparition des ferments digestifs pendant la vie foetale. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 619, 1920.
- PORCHER (Ch.), VERON et TAPERNOUX : Apparition de la présure pendant la vie foetale. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1439, 1920.
- PORTIER (P.) : *Les oxydases dans la série animale. Leur rôle physiologique*. Thèse Paris, 1897.
- POTTEVIN (H.) : Actions diastasiques réversibles. Formation et dédoublement des éthers-sels sous l'influence des diastases du pancréas. *Bull. Soc. Chim.*, **35**, 693, 1906.
- POZERSKI : Influence de la température sur l'invertine. *C. R. Soc. Biol.*, **53**, 26, 1901.
- PREYER : *Physiologie spéciale de l'embryon*. Paris, 1887.
- PRINGSHEIM et FUCHS : Ueber ein Komplement der Amylasen. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, **56**, 1762, 1923.
- PRZYLECKI (St. I) et PRZYLECKI (St. J.), NIEDZWZCKA, J. et J. MAJEWSKI : Les réactions enzymatiques dans un milieu macroscopiquement hétérogène. *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 935 et 937.
- RICHTER (Ch.) : De la Physiologie générale cellulaire étudiée par la fermentation lactique. *Arch. Intern. de Physiol.*, **18**, 1, 1921.

- RICHET (Ch.) : *Du suc gastrique chez l'homme et les animaux*. Thèse Paris, 1878.
- RICHET (Ch.) : *Des diastases chez les Poissons*. Trav. du labor. de Physiol. Paris, 1893.
- ROBERTSON and C. L. A. SCHMIDT : On the Part played by Alkali in the Hydrolysis of Proteins by Trypsin. *Journ. Biol. Chem.* **5**, 31, 1908.
- ROBERTSON and T. BRAILSFORD : Some chemical Properties of Casein and their possible Relation to the chemical Behaviour of other Protein Bodies, with especial Reference to Hydrolysis of Casein by Trypsin. *Journ. of Biol. Chem.*, **2**, 317.
- ROGER (H.) : Action de la salive chauffée. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 893, 1907.
- ROGER (H.) : Action du suc gastrique sur la salive. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 1021, 1907.
- ROGER (H.) : Influence des œufs de poule sur le pouvoir saccharifiant de la salive. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 16, 1908.
- ROGER (H.) : Influence des aliments sur l'activité de l'amylase pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 64, 1908.
- ROGER (H.) : Rôle des phosphates dans la saccharification salivaire. *C. R. Soc. Biol.*, **65**, 374, 1908.
- ROGER (H.) : Amylase du jaune d'œuf. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 1137, 1908.
- ROGER (H.) : *Digestion et Nutrition*. Masson, 1910.
- ROGER (H.) : *Questions actuelles de biologie médicale*. Masson. 1922.
- ROGER (H.) et L. BINET : Pouvoir lipasique des sucs pancréatique et intestinal. *Influence de la bile*. **85**, 648, 1921.
- ROGER (H.) et SIMON : Action synergique de la salive et du suc pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 1070, 1907.
- ROGER (H.) et SIMON : Sucs gastrique et pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 541, 1908.
- RONA (E.) : Ueber die Wirksamkeit der Fermente unter abnormen Bedingungen und über angebliche Aldehydatur der Enzym. *Bioch. Zeits.*, **109**, 279, 1920.
- RONA (E.) et BLOCH : Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Ueber die Wirkung des Chinins auf Invertase. *Bioch. Zeits.*, **118**, 185, 1921.
- SAINT-RAT (de) et RONFAUT : Sur le dosage de petites quantités de sucres réducteurs dans les liquides de l'organisme. *Bull. Sc. pharmac.*, **27**, 289, 1920.
- SCHAEFFER (G.) et TERROINE : Les ferments protéolytiques du suc pancréatique, trypsine et érepsine. 2. Action du suc sur les albumines et leurs produits de dégradation. *Journ. de Physiol. et Patho. gen.*, **12**, 905, 1910.
- SÉE : Les oxydases, leur rôle physiologique et leurs applications thérapeutiques. *Arch. gen. de Méd.*, **83**, 1812, 1906.
- SELLIER : Action protéolytique du suc digestif des Crustacés. *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 703, 1907.
- SHERMANN et M. WAYMANN : Effect of certain Antiseptics upon the Activity of Amylases. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **43**, 2454, 1921.
- SHERMANN et F. WALKER : The Influence of certain Amino-acids upon the enzymic Hydrolysis of Starch. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **43**, 2461, 1921.
- SIMON (L.-G.) : L'activité diastasique de la salive. *Journ. Physiol. pathol.*, **9**, 261, 1907.
- SIMONNET (H.) : De l'amylase. Liaison du ferment et des substances qu'il digère. *Bull. Soc. Chim.*, **7**, 1923.
- SLYKE, DONALD (D. van) and GLEM E. CULLEN : The Mode of Action of Amylase and of Enzymes in general. *Journ. Biol. Chem.* **19**, 141, 1914.
- SØRENSEN (S. P. L.) : Etudes enzymatiques. *C. R. Lab. de Carlsberg*, **7**, 1, 1907.
- SØRENSEN (S. P. L.) : Etudes enzymatiques. II Sur la mesure et l'importance de la concentration en ions H dans les réactions enzymatiques. *C. R. Lab. de Carlsberg*, **8**, 1, 1909.

- SÖRENSEN (S. P. L.) : Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionkonzentration bei biologischen Prozessen. *Ergebn.*, 393, 1912.
- TAKASAKA (T.) : Enzyme Content of Human Brain. *Bioch. Zeits.*, **184**, 390, 1927.
- TAYLOR (A. E.) : On the Reversion of tryptic Digestion. *Univ. Cal. Pub. Patho., Berken*, **1**, 65, 1904.
- TAYLOR (A. E.) : On the Synthesis of Protein through the action of Trypsin. *Journ. Biol. Chem.*, **3**, 87, 1910.
- TERRNOIE (E. F.) : Influence de la réaction du milieu sur la lipase pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **68**, 404, 1910.
- TERROINE (E. F.) : Action de la température sur la lipase pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **68**, 347, 1910.
- TERROINE (E. F.) et J. WEILL : Action des acides aminés sur la saccharification de l'amidon par le suc pancréatique. *C. R. Soc. Biol.*, **72**, 542, 1912.
- THIBAULT : De l'influence du contact de l'alcool sur l'activité de la pepsine. *Journ. Pharm. et Chimie*, Paris, **15**, 161, 1902.
- THOMAS (P.) : *Cours de Chimie Biologique. I. Partie générale*. Paris, 1926.
- TRAUBE : *Theorie der Fermentwirkungen*. Berlin, 1858.
- TRILLAT : Sur le rôle d'oxydases que peuvent jouer les sels manganéux en présence d'un colloïde. *C. R. Ac. Sc.*, **138**, 274, 1904.
- UTKIN-LJUBOWSOW (L.) : Zur Kenntnis der Blutproteasen. *Bioch. Zeits.*, **183**, 103, 1927.
- VAN'T HÖFF (J.H.) : Ueber synthetische Fermentwirkung. *Sitzb. Ber. k. Preuss. Akad.*, **48**, 963, 1910.
- VELLIZ : Recherches sur l'action inhibitrice des acides gras et, en particulier des acides non saturés sur les phénomènes diastasiques. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, **9**, 483, 1927.
- VERNON (H. M.) : The Conditions of Action of « Trypsin » on Fibrin. *Journ. Physiol.*, **28**, 375, 1900.
- VERNON (H. M.) : The protective Value of Proteids and their Decomposition Products on Trypsin. *Journ. Physiol.*, **31**, 346, 1904.
- VUALQUIN (E.) : Influence de la concentration ionique dans l'action hydrolysante de l'émulsine. *C. R. Soc. Biol.*, **70**, 270, 1911.
- WAELE (H. DE) : Recherches sur la coagulation du lait. *Ann. de Physiol. et Physicoch. Biol.*, **3**, 113, 1927.
- WALTERS : Studies on the Action of Trypsin. I. On the Hydrolysis of Casein by Trypsin. *Journ. Biol. Chem.*, **13**, 11, 267, 1912.
II A) On the Influence of the Products of Hydrolysis upon the Rate of Hydrolysis of Casein by Trypsin. B) The Autohydrolysis of the Caseinates. *Journ. of Biol. Chem.* **12**, 45, 1912.
- WELZMULLER : Die Abbaufähigkeit der Kuhmilchdiastase gegen verschiedene Stärkearten. *Bioch.-Zeits.*, **125**, 179, 1921.
- VIGNES (H.) : *Physiologie de l'embryon et du fœtus*, in Roger H. et L. Binet : *Traité de Physiologie normale et pathologique* ; 11, Masson, 1917.
- VINES (S. H.) : The proteolytic Enzymes of Nepenthes. *Ann. of Bot.*, **2**, 563, 1897 ; **12**, 545, 1898 ; et **15**, 563, 1901.
- VINES : The Protéases of Plantes. *Ann. of Bot.*, **18**, 289, 1904 ; **19**, 149, 1905, et **20**, 113, 1906.
- WILLSTATTER (R.) : Ueber Isolierung von Enzyme. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **55**, 3601, 1922.
- WILLSTATTER (R.) : *Problems and Methods in Enzym Research*. New-York, 1927.
- WILLSTATTER (R. J.), GRASER und R. KUHN : Zur Kenntnis des Invertins. *Zeits. für Physiol. Chem.*, **123**, 1, 1922.

- WILLSTATTER (R.), und R. KUHN : Ueber Spezifität der Enzyme. *Zeits. für physiol., Chem.*, **125**, 1, 1923 et **125**, 28, 1923.
- WILLSTATTER (R.), E. WALDSCHMIDT-LEITZ und F. MEMMEN : Bestimmung der pankreatischen Fettspaltung. *Zeits. für physiol. Chem.*, **125**, 93, 1923.
- WILLSTATTER (R.) und W. GRASSMANN : Abhandlung über Pflanzenproteasen. *Zeits für physiol. Chem.*, **138**, 184, 1924 ; **151**, 307, 1925-26 ; **153**, 250, 1925-26 ; et **167**, 202, 1927.
- WILLSTATTER (R. F.), HANROWITZ und F. MEMMEN : Abhandlung über Pankreasenzyme. *Zeits. für physiol. Chem.*, **133**, 347, 1923 ; **140**, 203, 1924 ; et **144**, 68, 1925.
- WILLSTATTER (R.) und F. MEMMEN : Abhandlung über Pankreasenzyme. *Zeits. für Physiol. Chem.*, **126**, 143, 1922 ; **129**, 1, 1923 ; **132**, 181, 1923 ; **138**, 216, 1924 ; **173**, 17, 1928 ; **173**, 155, 1928.
- WILLSTATTER (R.), R. KUHN und H. SOBOTKA : 4. Mitt. über Spezifität der Enzyme. *Zeits. für physiol. Chem.*, **129**, 33, 1923.
- WILLSTATTER (R.) und E. WALDSCHMIDT-LEITZ : Über Pankreaslipase. *Zeits. für Physiol. Chem.*, **125**, 132, 1923.
- WILLSTATTER (R.), und F. RAACKE : Zur Kenntnis des Invertins. *Ann. d. Chem.*, **425**, 1, 1920 et **427**, 111, 1921.
- WILLSTATTER (R.), E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. R. HESSE : Über Pankreasamylase. *Zeits für physiol. Chem.*, **126**, 143, 1923.
- WOHLGEMUTH (J.) : *Grundriss der Fermentmethoden*. Berlin, 1913.
- WOLFF (J.) : *Contribution à la connaissance de divers phénomènes oxydasiques naturels et artificiels*. Paris, 1910.
- ZSIGMONDY (A.) : *Kolloidchemie*. 3. Aufl. Leipzig 1920.
- ZUNZ (E.) : Contribution à l'étude des protéoses. *Arch. Intern. de Physiol.*, **5**, 245, 1907.

Imprimerie Alençonnaise, 9-13, Rue des Marcheries, Alençon.

